

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
KOMM.: PROF. DR. MED. BERND SALZBERGER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIE ROLLE VON ADIPONECTIN FÜR DIE MONOZYTÄRE EXPRESSION VON  
GALECTIN-3 BEI ÜBERGEWICHT UND TYP 2 DIABETES MELLITUS

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Markus Weber

2011



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
KOMM.: PROF. DR. MED. BERND SALZBERGER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIE ROLLE VON ADIPONECTIN FÜR DIE MONOZYTÄRE EXPRESSION VON  
GALECTIN-3 BEI ÜBERGEWICHT UND TYP 2 DIABETES MELLITUS

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Markus Weber

2011

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christa Büchler

2. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Thomas Weiß

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2011

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das metabolische Syndrom und damit assoziierte Erkrankungen</b>	<b>1</b>
1.1.1	Das metabolische Syndrom	1
1.1.2	Adipositas als zentraler Bestandteil des metabolischen Syndroms	2
1.1.3	Adipositas als Ursache chronischer Entzündung	2
1.1.4	Pathogenese der Insulinresistenz und des Typ 2 Diabetes mellitus	4
<b>1.2</b>	<b>Das Adipokin Adiponectin</b>	<b>5</b>
1.2.1	Struktur von Adiponectin	5
1.2.2	Isoformen von Adiponectin	6
1.2.3	Adiponectinrezeptoren	7
1.2.4	Regulation von Adiponectin	7
1.2.5	Adiponectin und das metabolische Syndrom	8
<b>1.3</b>	<b>Galectin-3</b>	<b>9</b>
1.3.1	Expressionsmuster von Galectin-3 und Sekretionsmechanismus	10
1.3.2	Struktur von Galectin-3 und Bindungsspezifität	13
1.3.3	Das Galectin-3-Gen	15
1.3.4	Funktion von Galectin-3	16
1.3.4.1	Galectin-3 in Fettgewebe und Immunzellen	17
1.3.4.2	Galectin-3 und Monozyten	18
<b>1.4</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>22</b>
2.1.1	Geräte	22
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3	Chemikalien	24
2.1.4	Antikörper	25
2.1.4.1	Primäre Antikörper	25
2.1.4.2	Sekundäre Antikörper	25
2.1.5	Kit-Systeme	26

---

2.1.6	Puffer und Lösungen	26
2.1.6.1	Lösungen für Arbeiten mit Proteinen	26
2.1.6.1.1	Lösungen für die Herstellung von Proteinextrakten	26
2.1.6.1.2	Lösungen für SDS-PAGE	26
2.1.6.1.3	Lösungen für Western Blot	27
2.1.6.1.4	Lösungen für Galectin-3-ELISA	28
2.1.6.1.5	Lösungen für Adiponectin-ELISA	29
2.1.6.2	Lösungen für die Isolation primärer humaner Monozyten	29
2.1.7	Primer für LightCycler-Analysen	29
2.1.8	Rekombinantes Adiponectin	30
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>31</b>
2.2.1	Erweiterung einer EDTA-Plasma-Bank männlicher Typ 2 Diabetiker und geeigneter Kontrollen	31
2.2.2	Isolation humaner peripherer Monozyten aus Vollblut	31
2.2.3	Herstellung von autologem Serum	33
2.2.4	Arbeiten mit cDNA/RNA	34
2.2.4.1	Isolation von RNA	34
2.2.4.2	Real-Time PCR	34
2.2.5	Proteinchemische Methoden	37
2.2.5.1	Präparation von Gesamtproteinextrakten	37
2.2.5.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	37
2.2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.2.5.4	Western Blot	38
2.2.5.5	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	39
2.2.5.5.1	Human Galectin-3 BMS279/2CE	40
2.2.5.5.2	DuoSet® ELISA Development System human Adiponectin	40
2.2.6	Stimulation von primären Monozyten	41
2.2.7	Statistik	42
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Einfluss von Adiponectin auf das monozytäre Galectin-3</b>	<b>43</b>
3.1.1	Reduktion des zellulären Galectin-3 durch Adiponectin	43
3.1.2	Verminderung der Galectin-3-mRNA-Expression durch Adiponectin	44
3.1.3	Abnahme des extrazellulären Galectin-3 durch Adiponectin	44
3.1.4	Wirkung von Adiponectin auf Galectin-3 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	45
3.1.5	Dosisabhängiger Effekt von Adiponectin auf die Galectin-3-Proteinmenge	46

---

<b>3.2</b>	<b>Wirkungsmechanismus der Adiponectin-vermittelten Suppression von Galectin-3</b>	<b>48</b>
3.2.1	Beteiligung des p38 MAP-Kinase-Weges an der Regulation von Galectin-3 durch Adiponectin	48
3.2.2	Aktivierung der AMPK durch Adiponectin	49
3.2.2.1	Reduktion der Galectin-3-Expression durch Metformin und AICAR	49
3.2.2.2	Wirkung des AMPK-Inhibitors Compound C auf die monozytäre Galectin-3-Reduktion durch Adiponectin	51
<b>3.3</b>	<b>Lipide und ihr Effekt auf die monozytäre Galectin-3-Konzentration</b>	<b>52</b>
3.3.1	Fehlende Beeinflussung des endogenen Galectin-3 durch freie Fettsäuren	52
3.3.2	Auswirkung des zellulären Cholesterin-Spiegels auf Galectin-3	53
<b>3.4</b>	<b>Monozytäre Galectin-3-Spiegel in den drei Kollektiven NW, OW und T2D</b>	<b>54</b>
3.4.1	Vergleich der basalen zellulären Galectin-3-Expression in den Monozyten der drei Gruppen NW, OW und T2D	54
3.4.2	Bestimmung der basalen Konzentration von löslichem Galectin-3 in den Monozyten der drei Kollektive	57
3.4.3	Korrelationen von zellulärem und löslichem Galectin-3 zu anthropometrischen und biochemischen Charakteristika der Spender	59
<b>3.5</b>	<b>Effekt von Adiponectin auf monozytäres Galectin-3 in den drei Versuchsgruppen</b>	<b>61</b>
3.5.1	Gestörte Adiponectin-vermittelte Suppression von zellulärem Galectin-3 in Monozyten von Typ 2 Diabetikern	61
3.5.2	Gestörte Reduktion von löslichem Galectin-3 durch Adiponectin in Monozyten von Typ 2 Diabetikern	62
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>Regulation von Galectin-3 durch Adiponectin</b>	<b>63</b>
4.1.1	Galectin-3 – ein proinflammatorisches Protein	63
4.1.2	Reduktion des monozytären Galectin-3 durch Adiponectin	63
<b>4.2</b>	<b>Mögliche Signaltransduktion der Adiponectin-vermittelten Wirkung auf Galectin-3</b>	<b>64</b>
4.2.1	Rolle der AMPK im metabolischen Geschehen	64
4.2.2	Agonisten der AMPK	65
4.2.3	Beteiligung der AMPK an der Regulation von Galectin-3 durch Adiponectin	66

---

4.2.4	Der p38 MAP-Kinase-Signalweg	66
4.2.5	Vermittlung der Adiponectinwirkung auf Galectin-3 durch die p38 MAP-Kinase	67
<b>4.3</b>	<b>Veränderungen von Galectin-3 im Kontext des metabolischen Syndroms</b>	<b>68</b>
4.3.1	Rolle von Adiponectin in der Pathogenese des metabolischen Syndroms	68
4.3.2	Galectin-3-Spiegel in den drei Kollektiven	69
4.3.3	Zusammenhang von Adiponectin und Galectin-3	70
4.3.4	Das metabolische Syndrom als inflammatorische Reaktion	70
4.3.5	Einfluss inflammatorischer Stimuli auf die Galectin-3-Expression	71
<b>4.4</b>	<b>Rolle von Galectin-3 im Rahmen des metabolischen Syndroms</b>	<b>72</b>
4.4.1	Beteiligung von Galectin-3 an der Regulation von Apoptose	72
4.4.2	Assoziation von Diabetes und der Entstehung eines Immundefizits	73
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>87</b>



---

**Abkürzungsverzeichnis**

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Acrp30	Adipocyte complement-related protein of 30 kDa
AdipoR1	Adiponectinrezeptor 1
AdipoR2	Adiponectinrezeptor 2
AIcAR	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-1-4-Ribofuranosid
AK	Antikörper
AMP	Adenosine 5' Monophosphate
AMPK	Adenosine 5' Monophosphate – Activated Protein Kinase
Apm	Adiponectin
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
ATP	Adenosine Triphosphate
AU	Arbitrary Units
BCA	Bicinchoninsäure
BHK	Baby Hamster Kidney
BMI	Body Mass Index
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNA (complementary DNA)
Comp C	Compound C
Cp	Crossing Point
CpG	Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin
CRD	Kohlenhydratbindungsstelle (Carbohydrate Recognition Domain)
CRE	cAMP Responsive Element
CRP	C-reaktives Protein
CSF1	Colony-Stimulating-Factor-1
C-terminal	Carboxy-terminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cu	Kupfer

---

ddH <sub>2</sub> O	Bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGIR	European Group for the Study of Insulin Resistance
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii (lat.: und andere)
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FGF	Fibroblast Growth Factor
FMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
Fuc	Fukose
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
Gal	Galaktose
Gal-3	Galectin-3
Glc	Glukose
Glut-4	Glukosetransporter-4
Gly	Glycin
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HDL	High Density Lipoprotein
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HMW	High Molecular Weight Form
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase)
IDF	International Diabetes Federation
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Immunglobulin
IGT	Impaired Glucose Tolerance
IKK-β	Inhibitor der NF-κB Kinase β
IL-1	Interleukin-1
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-13	Interleukin-13

---

JNK1	c-Jun NH(2)-terminal Kinase 1
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
LMW	Low Molecular Weight Form
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MCSF-1	Macrophage Colony-Stimulating-Factor 1
Metf	Metformin
MMW	Medium Molecular Weight Form
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NAc	N-Acetyl
NF-κB	Nuclear Factor κB
NO	Stickstoffmonoxid
N-terminal	Amino-terminal
N-Terminus	Amino-Terminus
NW	Normalgewichtige Kontrollen
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Hyperoxid-Anion
OA	Ölsäure
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
OW	Übergewichtige Kontrollen
PA	Palmitinsäure
PAF	Thrombozyten-aktivierender Factor (Platelet Activating Factor)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI-2	Plasminogen Activator Inhibitor Typ 2
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PPARα	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	Reverse

---

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SIE	Sis Inducible Element
siRNA	Small Interfering RNA
Ser	Serin
T2D	Typ 2 Diabetiker
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Trispuffer (Tris Buffered Saline)
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethyldiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl-) aminomethan
Trp	Tryptophan
uni	Universe
UTR	Untranslated Region
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
WHO	World Health Organization
WHR	Waist to Hip Ratio

---

# **1 Einleitung**

## **1.1 Das metabolische Syndrom und damit assoziierte Erkrankungen**

### **1.1.1 Das metabolische Syndrom**

Mit dem Begriff des metabolischen Syndroms bezeichnet man ein Krankheitsbild, das im Zusammenhang mit der Veränderung der Lebens- und Ernährungsgewohnheiten vor allem in den Industrieländern zunehmend an Bedeutung gewinnt. Als Erstbeschreiber dieses Krankheitsbildes imponiert Gerald Reaven, der 1988 eine metabolische Funktionsstörung als Syndrom X benannte. Heute werden die Begriffe metabolisches Syndrom, Syndrom X oder auch tödliches Quartett im Allgemeinen synonym verwendet. Ein weitestgehender Konsens herrscht über die Kernelemente, die das metabolische Syndrom bilden. Sie beinhalten die Komponenten Adipositas, Hypertonie, eine gestörte Glukosetoleranz sowie Dyslipidämie in Form von erhöhten Triglyzeridwerten und erniedrigtem HDL-Cholesterin. Jedoch legen die einzelnen Organisationen unterschiedliche Kriterien zur Diagnose des metabolischen Syndroms fest. So haben zum Beispiel nur die World Health Organization (WHO) und die European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) die Insulinresistenz in ihrer Definition aufgenommen, obwohl sie einen wichtigen unumstrittenen pathophysiologischen Parameter darstellt. Im Gegenzug ist allein bei der International Diabetes Federation (IDF) der Bauchumfang ein Bestandteil der Definition. Diese Heterogenität erschwert es, vom metabolischen Syndrom als einheitlichem Krankheitsbild zu sprechen. Aufgrund dieser Tatsache gestaltet es sich schwierig, detaillierte Angaben zur Prävalenz anzuführen. Was jedoch festgehalten werden kann, ist, dass das metabolische Syndrom mit dem Alter zunehmend häufiger auftritt und vom Geschlecht und der ethnischen Zugehörigkeit abhängt. [1-2]

Betrachtet man die Pathophysiologie dieses Krankheitsbildes, so lässt das tödliche Quartett die Vollaussprägung eines langsam progredienten Vorgangs erkennen. Gerade in der westlichen Welt ist in immer häufigerem Ausmaß unausgewogene Ernährung mit einem Mangel an Bewegung vergesellschaftet. Dies erklärt das vermehrte Auftreten von Adipositas, die wiederum zu einer Insulinresistenz und einer verringerten Glukosetoleranz führen kann. Schreitet dieser Prozess allmählich weiter fort, entwickelt sich hieraus Diabetes mellitus Typ 2 mit all seinen potentiellen

Komplikationen wie diabetischer Polyneuropathie, Nephropathie und einem gesteigerten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen. [2-5]

### **1.1.2 Adipositas als zentraler Bestandteil des metabolischen Syndroms**

Überhöhtes Körpergewicht stellt laut WHO eines „der schwerwiegendsten Probleme für die öffentliche Gesundheit im 21. Jahrhundert“ dar. Besorgniserregend ist zudem die Tatsache, dass der Anteil der Übergewichtigen nicht nur bei Erwachsenen, sondern insbesondere auch bei Kindern drastisch steigt. Gerade in dieser Gruppe soll das Auftreten von Adipositas vermieden werden, da es ein wesentlicher Gesichtspunkt des metabolischen Syndroms ist und sozusagen als Ausgangspunkt für die Entstehung dieses Krankheitsbildes aufgefasst werden kann. Eine Quantifizierung des Übergewichts lässt sich durch den Body Mass Index (BMI) vornehmen, der sich aus der Körpergröße und dem Körpergewicht zusammensetzt:  $BMI = \text{Körpergewicht [kg]} / \text{Körpergröße [m}^2\text{]}$ . Gemäß der WHO-Klassifikation von 1997 gelten Erwachsene mit einem  $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$  als übergewichtig, ab einem  $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$  als adipös. [6] Eine weitere Einteilung von Übergewichtigen wird durch die Waist to Hip Ratio (WHR) ermöglicht. Die WHR errechnet sich wie folgt:  $WHR = \text{Taillenumfang [cm]} / \text{Hüftumfang [cm]}$ . Dabei werden laut WHO Werte größer 0,9 bei Männern und größer 0,85 bei Frauen als pathologisch angesehen. Der Vorteil dieses Parameters ist, dass er nicht das Absolutgewicht, sondern primär das Fettverteilungsmuster berücksichtigt und so den pathogenetisch bedeutsameren viszeralen Fettanteil reflektiert. Dem steht jedoch gegenüber, dass der BMI ein im klinischen Alltag praktikablerer Wert ist, der als Standard zur Übergewichtsklassifikation weltweit etabliert ist. In der folgenden Arbeit wird daher ein  $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$  zur Definition von Übergewicht verwendet. [1]

### **1.1.3 Adipositas als Ursache chronischer Entzündung**

Dass das Fettgewebe nicht allein als Speicher von Triglyzeriden dient, lässt sich bereits daran erkennen, dass ein erhöhter BMI mit dem Anstieg der Serumwerte systemischer Entzündungsmarker wie C-reaktivem Protein (CRP), Interleukin-6 (IL-6), Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1), P-Selektin, Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), Fibrinogen, Angiotensinogen, Serumamyloid A3 und 1-Azid-Glycoprotein einhergeht. [7-8] Betrachtet man Adipozyten näher, so stellt man fest,

dass sie die Fähigkeit besitzen, auf infektiöse Agentien und Zytokin-vermittelte, inflammatorische Signale zu reagieren. Hierzu exprimieren sie eine Reihe von Rezeptoren wie Toll-like Rezeptor 4 (TLR4), deren Stimulation zur Aktivierung multipler Signaltransduktionskaskaden führt und die Sekretion potenter inflammatorischer Zytokine und Akutphaseproteine wie IL-6 und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induziert. TLR4 wird dabei nicht nur durch Lipopolysaccharid (LPS) aktiviert, sondern zusätzlich durch Fettsäuren, wodurch sich eine Verknüpfung von Metabolismus und Entzündung zeigt. Außerdem wird bei Adipozyten die Fähigkeit zur Phagozytose beobachtet, eine Eigenschaft, die ein Charakteristikum für Zellen des Immunsystems ist. [8]

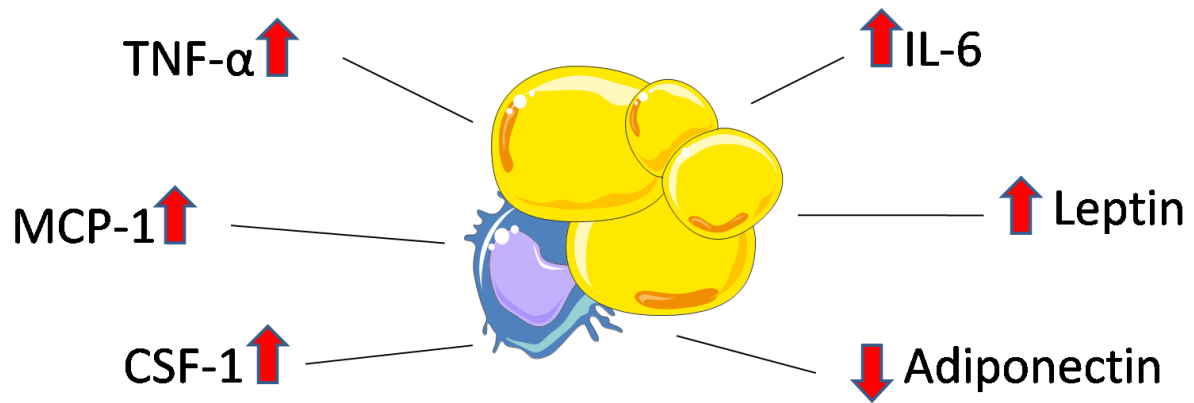
5 bis 10 % der Zellen des Fettgewebes sind Makrophagen. Im Rahmen einer Gewichtszunahme kann ihr Anteil aber auf bis zu 60 % steigen, wobei der Infiltrationsgrad positiv mit dem BMI korreliert und der Effekt im viszeralen Fett in ausgeprägterer Form auftritt als im Subkutangewebe. [9-10] Die Makrophagen im Fettgewebe leiten sich von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab. Als mögliche Ursache für die vermehrte Makrophagenzahl sind bei Adipositas die Zytokine Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) und Colony Stimulating Factor-1 (CSF-1) erhöht, die wichtige Mediatoren der Chemotaxis und Differenzierung von Makrophagen darstellen und von Adipozyten sezerniert werden. Die Höhe der Sekretion von MCP-1 scheint direkt die Insulinsensitivität zu beeinflussen, was auf eine Beteiligung der durch Makrophagen vermittelten Entzündungsreaktion in der Pathogenese der Insulinresistenz schließen lässt. [9-10] Ergänzend zu den Adipozyten sind Makrophagen für einen wesentlichen Bestandteil der Produktion proinflammatorischer Zytokine im Fettgewebe, vor allem TNF- $\alpha$ , verantwortlich. Adipozyten und Makrophagen agieren dabei nicht unabhängig voneinander, sondern stimulieren synergistisch die inflammatorische Aktivität des jeweils anderen. [8-9] Zusammen tragen diese beiden Zellpopulationen dazu bei, dass ein Zuwachs von Fettgewebe zu einer vermehrten Produktion von Entzündungsmediatoren führt. Adipositas kann daher als Form einer systemischen, chronischen Entzündung aufgefasst werden, die sich im Zuge weiterer Progredienz zu Insulinresistenz und letztendlich zum metabolischen Syndrom als Vollbild entwickeln kann.

#### **1.1.4 Pathogenese der Insulinresistenz und des Typ 2 Diabetes mellitus**

Um zu verstehen, wie Übergewicht mit der Insulinsensitivität in Verbindung steht, ist es unerlässlich, das Fettgewebe nicht als inertes Speichergewebe zu betrachten, sondern dessen Rolle als endokrines Organ, das durch die Synthese von Mediatoren Anteil an systemischen Prozessen in Form einer chronischen Entzündungsreaktion nimmt, zu verstehen. Dieses inflammatorische Geschehen kann eine verminderte Reaktion des Körpers gegenüber Insulin bewirken. Die einzelnen Mechanismen hierfür auf molekularer Ebene sind komplex und vielfältig. So üben die bei Adipositas gesteigerten Konzentrationen von TNF- $\alpha$  einen hemmenden Einfluss auf die Insulinsignaltransduktion aus, indem sie die Tyrosinphosphorylierung am Insulinrezeptor inhibieren und das Insulinsignal abschwächen. [11-12] Sabio et al. fanden heraus, dass eine Hochfettdiät zu einer Aktivierung von c-Jun NH(2)-terminal Kinase 1 (JNK1) führt. Dieses regulatorische Protein steigert die IL-6-Produktion im Fettgewebe und verschlechtert die Insulinsensitivität der Leber. [13] Zudem scheint auch die Aktivierung des Inhibitors der NF- $\kappa$ B Kinase  $\beta$  (IKK- $\beta$ ) in den Makrophagen involviert zu sein. Dieses Enzym koordiniert inflammatorische Antworten über Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) und bewirkt eine vermehrte Produktion von Entzündungsmediatoren. [14]

Ein weiteres wichtiges Adipokin ist Adiponectin. Dieses Hormon verstärkt die Insulinsensitivität, jedoch sinken seine Blutspiegel mit zunehmender Körperfettmasse. Aufgrund seiner wachsenden Bedeutung im Metabolismus und der Pathogenese der Insulinresistenz wird im Folgenden noch detailliert auf dieses Hormon eingegangen. [15] Um die periphere Insulinresistenz zu kompensieren, ist eine immer größere Insulinmenge erforderlich. Die erhöhten Insulinspiegel ihrerseits führen durch eine Abnahme der Insulinrezeptordichte und ein gesteigertes Hungergefühl zu einem Verstärken der Insulinresistenz, was letztendlich in einem Circulus vitiosus mündet. [5] Eine Zusammenfassung der bei Adipositas veränderten Zytokin- und Adipokinproduktion ist in Abbildung 1 dargestellt.





**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der veränderten Zytokin- und Adipokinproduktion im Fettgewebe bei Adipositas

## 1.2 Das Adipokin Adiponectin

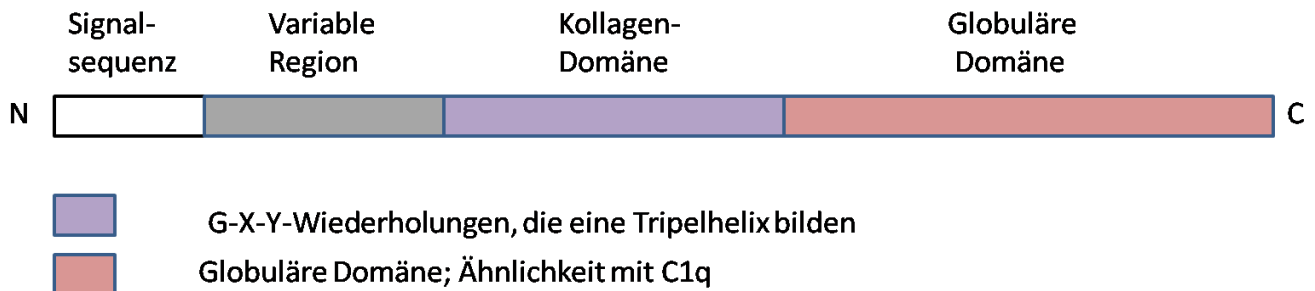
1995 gelang unter anderen Scherer et al. die Entdeckung eines bisher unbekannten Proteins, das ausschließlich von Adipozyten gebildet wird und im Serum nachgewiesen werden kann, dem Adiponectin. Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit dem Komplementfaktor C1q wurde es zunächst als Adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30) bezeichnet. [16] Dieses Hormon nimmt eine Schlüsselfunktion in der Regulation von Insulinsensitivität und inflammatorischen Reaktionen ein. [17]

### 1.2.1 Struktur von Adiponectin

Adiponectin wird durch das Gen APM-1 codiert. Dieses Gen befindet sich auf dem Chromosomenabschnitt 3q27 und besteht aus 3 Exons, von denen nur das zweite und dritte Exon zum translatierten Protein beitragen. [18-19] Das Hormon Adiponectin wird spezifisch von Adipozyten hergestellt, wobei seine Synthese während der Adipozytenreifung um den Faktor 100 ansteigt. [16] Anschließend wird es in die Blutbahn sezerniert und erreicht im Serum eine Konzentration von 3-30  $\mu\text{g/ml}$  sowie einen Proteinanteil von 0,01% am gesamten Plasmaprotein. [20]

Das Protein Adiponectin ist aus insgesamt 244 Aminosäuren aufgebaut und gehört zur C1q-Proteinfamilie. Es besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid, gefolgt von einer kurzen, nicht-helikalen, variablen Region, die keine Homologie zu anderen Proteinen zeigt, 22 G-X-Y- oder G-X-X-Kollagen-Wiederholungen, die eine Kollagen-

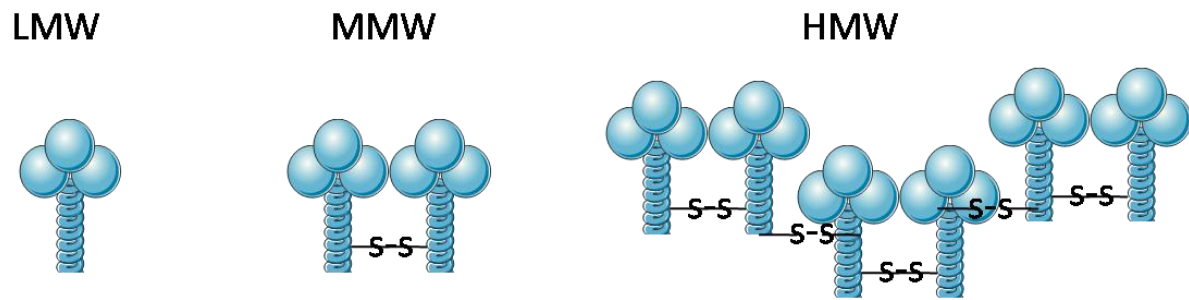
Tripelhelix-Formation bilden, und einer globulären Domäne am C-Terminus. Adiponectin weist nicht nur eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit dem Komplementfaktor C1q auf, sondern durch seine globuläre Domäne auch eine große Homologie mit den Kollagenen Typ VIII und X (Abbildung 2). [17, 21-22]



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Proteinstruktur von Adiponectin  
(modifiziert nach Whitehead et al.[17])

### 1.2.2 Isoformen von Adiponectin

Von den Adipozyten des menschlichen Fettgewebes wird Adiponectin in mehreren verschiedenen Isoformen sezerniert. Ein Homotrimer aus drei 30 kDa-Einheiten bildet die sogenannte Low Molecular Weight Form (LMW) des Proteins. Durch Ausbildung von Disulfidbrücken entsteht ein Hexamer, welches auch als Medium oder Middle Molecular Weight Form (MMW) bezeichnet wird. Schließlich existieren aber ebenso multimere Isoformen aus vier bis sechs Homotrimeren, die durch Hydroxylierungen und Glykosylierungen von Lysinresten in der Kollagen-Domäne stabilisiert werden und folglich die High Molecular Weight Form (HMW) von Adiponectin bilden (Abbildung 3). Die homotrimere Form des Hormons besitzt laut Pajvani die höchste Bioaktivität, worauf die Beobachtung schließen lässt, dass multimere Adiponectinisoformen auf der Oberfläche von Zielzellen zum Teil zu homotrimeren Einheiten reduziert werden. [23-25] Neuere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass die HMW-Form die biologisch aktivere darstellt. [26-28]



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Isoformen von Adiponectin

### 1.2.3 Adiponectinrezeptoren

Bisher konnten zwei Adiponectinrezeptoren identifiziert werden, AdipoR1 und AdipoR2. Diese werden im humanen und murinen Gewebe ubiquitär exprimiert, erreichen aber in Leber, Pankreas, Fettgewebe und Muskulatur eine besonders hohe Dichte. Zudem ist bekannt, dass T-Cadherin, welches in Endothelien und in der glatten Muskulatur vorkommt, ebenfalls Adiponectin binden kann, allerdings mit einer Präferenz für die HMW-Form des Peptidhormons. AdipoR1 ist in der Lage, die Adenosine 5' Monophosphate – Activated Protein Kinase (AMPK) zu aktivieren, während AdipoR2 die Insulinsensitivität verbessert und den Grad der Leberverfettung reduziert, indem es den Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) stimuliert. [17] Im Mausmodell führte eine Aktivierung von AdipoR1 in der Leber zu einer verminderten Expression von Enzymen der Glukoneogenese und der Lipogenese, während AdipoR2 eine Reduktion der Triglyzeridspeicher in der Leber zur Folge hatte.[29]. Als Sensor für den Energiestatus einer Zelle wird die AMPK durch steigende AMP-Konzentrationen, Adiponectin und weitere Stimuli aktiviert und stimuliert ATP-generierende Stoffwechselwege. Das Medikament Metformin vermittelt einen Teil seines antidiabetischen Effekts über die Aktivierung der AMPK. [30]

### 1.2.4 Regulation von Adiponectin

Die Höhe der Adiponectinkonzentration in humanem Plasma zeigt eine starke negative Korrelation zum Körpergewicht bzw. dem Körperfettanteil. Im Gegensatz zu anderen Adipokinen wird bei Personen mit Übergewicht, das heißt einem vermehrten Anteil an Körperfettmasse, keine Erhöhung, sondern eine signifikante Verminderung

des Adiponectinspiegels beobachtet. [20] Bei sehr schlanken oder gar untergewichtigen Menschen, z.B. im Rahmen einer Anorexia nervosa, wird eine erhöhte Konzentration im Plasma gefunden. Diese Veränderung der Adiponectinkonzentration in Abhängigkeit von der Körperfettmasse ist dabei mit der Plasmakonzentration proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 assoziiert. Diese ebenfalls zur Familie der Adipokine gehörenden Metabolite steigen bei Adipositas an und führen zu einer Repression von Adiponectin. Bei übergewichtigen Personen besteht folglich ein negativer Zusammenhang zwischen Adiponectin und den Zytokinen TNF- $\alpha$  und IL-6. [31-32]

Interessanterweise zeigten Frauen im Vergleich zu Männern deutlich höhere basale Adiponectinspiegel im Serum, obwohl sie einen physiologisch größeren Fettgewebsanteil besitzen. Zudem ist bei Männern der Anteil von HMW-Multimeren am Gesamtadiponectin im Vergleich zu Frauen erniedrigt. [25, 32-33]

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass eine stärkere negative Korrelation der Expression und Sekretion von Adiponectin zu der intraabdominellen Akkumulation von Adipozyten besteht als zu einer vermehrten subkutanen Fettspeicherung. Die Höhe des Adiponectinspiegels im humanen Serum wird folglich also nicht nur von der absoluten Masse, sondern auch von der Verteilung des Fettgewebes im Körper beeinflusst. Diese Depotspezifität vermag einen Hinweis zu geben, warum der viszerale Fettanteil in höherem Maße als der BMI gesundheitsprognostische Relevanz besitzt. [34-35]

### **1.2.5 Adiponectin und das metabolische Syndrom**

Wie mehrere Publikationen zeigen, ist Adiponectin mit einer erhöhten Insulinsensitivität assoziiert und weist damit antidiabetische Eigenschaften auf. Neben vielen Studien an Nagetieren gibt es auch Hinweise aus Untersuchungen am Menschen. Patienten mit Übergewicht und Typ 2 Diabetes mellitus im Rahmen eines metabolischen Syndroms haben eine signifikant niedrigere Adiponectinkonzentration im Serum. Eine Gewichtsreduktion hatte bei diesen Patienten nicht nur einen deutlichen Anstieg des Adiponectinspiegels zur Folge, sondern führte auch zu einer messbaren Reduktion der Insulinresistenz. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass eine Hypoadiponectinämie mit einer verminderten Empfindlichkeit des Körpers für Insulin assoziiert ist, wobei sich diese Korrelation auch unabhängig vom Körpergewicht bestätigte. Adiponectin als Insulin-Sensitizer des Organismus bewirkt

zudem eine Verminderung der Glukoneogenese der Leber und übt über diese Eigenschaft einen antidiabetischen Effekt auf den Blutzuckerstoffwechsel aus. Glitazone als orale Antidiabetika erhöhen den Adiponectinspiegel, wodurch sich ein Teil ihrer Wirkung erklären lässt. [15, 36-39] Im Tiermodell konnte bereits mit Substanzen, die selektiv die HMW-Adiponectinmenge erhöhten, eine Verbesserung der Hyperglykämie und der Insulinresistenz erzielt werden. Dies verdeutlicht, dass nicht allein die Gesamtmenge von Adiponectin entscheidend ist, sondern insbesondere dem Anteil an HMW-Adiponectin eine große Bedeutung beigemessen werden muss. [40]

### 1.3 Galectin-3

Galectin-3 ist ein Mitglied  $\beta$ -Galactosid-bindender Lektine, also Proteine, die an bestimmte Zucker binden und daher spezielle Glykokonjugate erkennen können. Die große Familie der Lektine lässt sich in vier Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe bilden die C-Typ Lektine, wozu Selectine gezählt werden. Des Weiteren werden noch P-Typ Lektine, Pentaxine und als letzte Gruppe Galectine unterschieden. Galectine wurden auch als S-Typ oder als S-Lac Lektine bezeichnet. Der Buchstabe S bedeutet, dass die Proteinaktivität von der Anwesenheit von Thiolen und damit reduzierenden Bedingungen abhängt. Diese Eigenschaft traf zwar auf das als erstes entdeckte Galectin-1 zu, bestätigte sich aber bei vielen anderen Galectinen nicht. Daher gilt die Bezeichnung mittlerweile als überholt und obsolet, auch wenn sie teilweise immer noch als Synonym verwendet wird. [41-42]

Galectine zeichnen sich durch zwei Charakteristika aus, die auch für die Einordnung in diese Gruppe erforderlich sind: erstens, der Fähigkeit,  $\beta$ -Galaktoside zu erkennen, und zweitens, einer starken strukturellen Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz, insbesondere der Kohlenhydratbindungsstelle (CRD). Die typische CRD besteht aus 135 Aminosäuren und ist in eine 5 – 6-strängige  $\beta$ -Faltblattstruktur gefaltet. Der Basisligand für die CRD ist N-Acetyl-Laktose. Die einzelnen Galectine werden bei den Säugetieren konsekutiv nummeriert, wobei bisher 15 verschiedene Mitglieder beim Menschen in der Literatur beschrieben sind. Zur weiteren Differenzierung dieser Proteingruppe nahmen Hirabayashi et al. eine Unterteilung in Galectine vom Prototyp, vom Tandemrepeattyp und vom Chimäratyp vor. Prototyp-Galectine bilden nicht-kovalente Homodimere, deren Untereinheiten jeweils eine CRD besitzen. Sie weisen daher zwei identische CRDs auf, die nicht-kovalent miteinander verbunden

sind. Zu dieser Untergruppe zählen Galectin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, und -14. Im Gegensatz dazu sind Galectine vom Tandemrepeattyp Proteine mit zwei unterschiedlichen CRD, die kovalent miteinander verbunden sind. Zu ihren Vertretern zählen Galectin-4, -6, -8, -9, und -12. Galectine vom Chimäratyp sind aus einer C-terminalen CRD und einer N-terminalen Domäne, die reich an Prolin, Glycin und Tyrosin ist, aufgebaut. Als einziges Mitglied dieser Familie ist bisher nur Galectin-3 beschrieben. Die Analyse von Gendatenbanken hat zur Entdeckung weiterer Galectin-ähnlicher Proteine in Invertebraten und Pflanzen geführt, wobei die Fähigkeit der Kohlenhydratbindung strukturell in der Evolution stark konserviert zu sein scheint. [43-47]

### **1.3.1 Expressionsmuster von Galectin-3 und Sekretionsmechanismus**

Zuerst wurde Galectin-3 als Oberflächenantigen Mac-2 auf Makrophagen entdeckt, die zuvor mit Thioglykol aktiviert worden waren. In der Folgezeit wurden in zahlreichen Zellen und Geweben, wie 3T3 Fibroblasten, verschiedenen Tumoren, Lungenparenchym, Nierenparenchym sowie basophilen Granulozyten, Proteine beschrieben, die als Galectin-3 identifiziert werden konnten. Bei Galectin-3 handelt es sich daher nicht um ein gewebetypisches oder sogar zellspezifisches Protein, vielmehr kann man zusammenfassend von einem ubiquitären und heterogenen Verteilungsmuster sprechen. [48]

Betrachtet man die Proteinstruktur von Galectin-3, so lässt es die Schlussfolgerung zu, dass es sich hierbei um ein zytoplasmatisches Protein handeln muss: Der N-Terminus ist acetyliert, es fehlt eine Signalsequenz, die für den klassischen Sekretionsmechanismus via rauem Endoplastischem Retikulum und Golgi-Apparat notwendig ist, und auch die Translation findet an freien Ribosomen im Zytoplasma statt. Dies sind alles Hinweise darauf, dass Galectin-3 intrazelluläre Aufgaben erfüllt. [46]

Dem widerspricht die Tatsache, dass Galectin-3 an der Zelloberfläche anzutreffen ist. An der Zellmembran bindet es an Glykoproteine, die Polylaktosaminstrukturen beziehungsweise Zuckerreste aufweisen, die von der CRD erkannt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Galectin-3 von Zellen in den Extrazellularraum freigesetzt wird, wobei bei verschiedenen Zellarten die Rate stark variieren kann. So findet die Externalisation bei Baby Hamster Kidney (BHK)-Zellen

nur langsam statt, während Makrophagen in Zellkultur innerhalb von einigen Stunden bis zur Hälfte des neu synthetisierten Proteins ins Medium abgeben können. [49-51] Der Begriff Externalisation ist dem Begriff Sekretion vorzuziehen, da es sich beim Ausschleusvorgang nicht um den klassischen Sekretionsmechanismus handelt, sondern ein alternativer Mechanismus verwendet wird. Dies erklärt auch, warum Substanzen wie Brefeldin A und Monensin, die den klassischen Weg über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat blockieren, die Galectinfreisetzung nicht inhibieren können, beziehungsweise am Beispiel von Monensin sogar steigernd wirken. Ebenso stimulieren Hitzeschockproteine und die Calciumionophore A23187 und Valinomycin das Ausschleusen von Galectin-3. Ein gegenteiliger Effekt wird bei Substanzen wie Nocodazol und einem Temperaturabfall auf 20°Celsius beobachtet. Da Nocodazol seine Wirkung über die Mikrotubuli der Zelle entfaltet, kann deren Beteiligung an der Galectinfreisetzung angenommen werden. Dieser alternative Weg, Proteine aus der Zelle in den Extrazellularraum zu befördern, wird auch von einer Reihe anderer Proteine benutzt. So gelangen viele Zytokine und Wachstumsfaktoren wie Interleukin-1 (IL-1), Fibroblast Growth Factor (FGF), Discoidin und einige Annexine ohne Signalsequenz vom Zytoplasma über die Zellmembran nach außen. [49, 52-53]

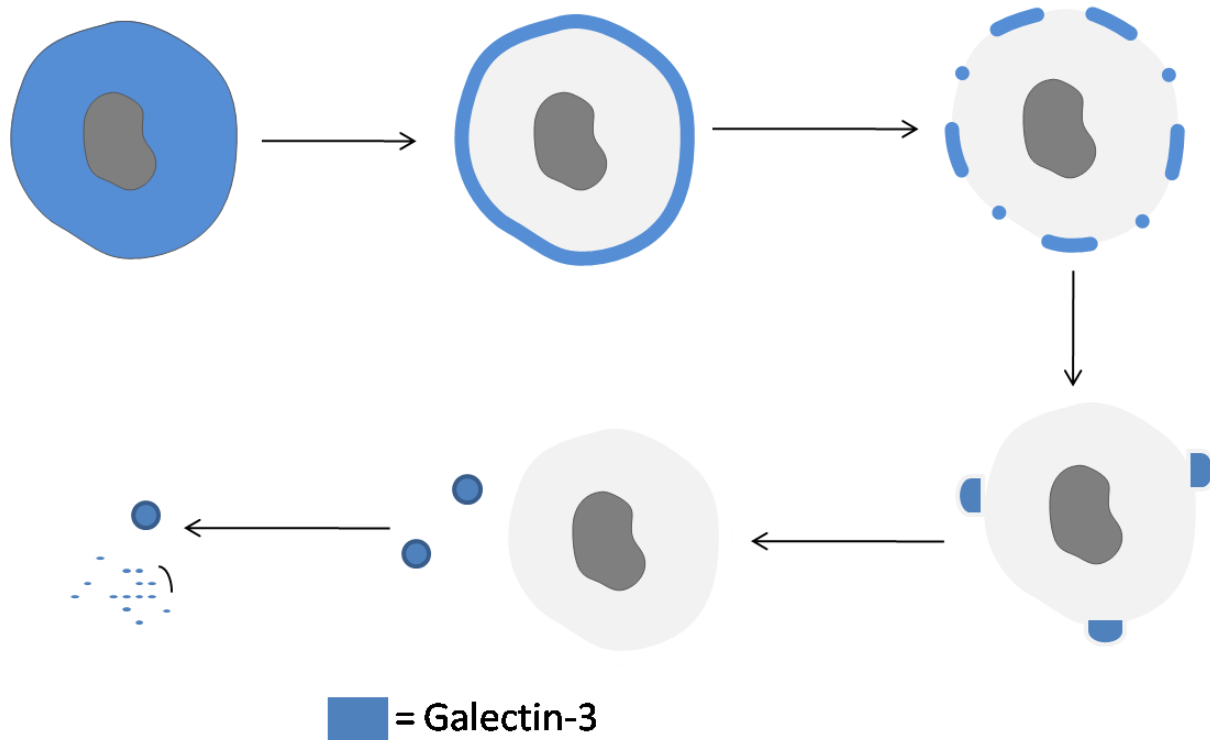
Der genaue Mechanismus dieses Vorgangs konnte zwar bisher noch nicht beleuchtet werden, doch gibt es zwei Theorien, wie der sogenannte „alternative Sekretionsmechanismus“ funktionieren soll. Eine Möglichkeit setzt das Vorhandensein spezieller Transporter voraus, die über ihre Transmembrandomänen Galectin-3 durch die Plasmamembran nach extrazellulär befördern können, wie es bei Zellen im Rahmen des Exports bestimmter bakterieller Toxine beobachtet werden kann. Als Alternative hierzu besagt die zweite Hypothese, dass Galectin-3 mit Hilfe eines apokrinen Sekretionsmechanismus externalisiert wird. Dafür sammelt sich das zunächst im Plasma homogen verteilte Galectin-3 an Bereichen nahe der Plasmamembran der Zelle, dem Ektoplasma, an. Im nächsten Schritt konzentriert sich Galectin-3 um bestimmte Stellen der Membran, an denen sich Evaginationen bilden. Diese Ausstülpungen schnüren sich von der Zelle ab und lösen sich als Vesikel, die mit Galectin-3 angereichert sind, von der Zellmembran. Im letzten Schritt wird das Protein aus den Vesikeln in den Extrazellularraum freigesetzt. Der Mechanismus ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. [48, 52, 54]

Zur Untermauerung dieser Hypothese entdeckten Mehul et al., dass den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt die Wanderung von Galectin-3 vom Ort der Biosynthese zur Plasmamembran bildet. Das Signal für die Externalisierung scheint dabei auf der N-terminalen Domäne von Galectin-3 zu liegen. Außerdem wurde festgestellt, dass Galectin-3 zuerst in Vesikeln externalisiert und von dort aus ins extrazelluläre Medium freigesetzt wird. Auf die Bedeutung der N-terminalen Domäne verweisen zudem Experimente mit transfizierten COS-Zellen, die nur die CRD von Galectin-3 exprimieren. Bei diesen Zellen akkumuliert das Protein lediglich im Bereich der Zellmembran, wohingegen eine Externalisierung nicht mehr möglich ist. Im Gegensatz dazu gelang es, zytosolische Proteine, die zuvor mit der N-terminalen Domäne von Galectin-3 fusioniert worden waren, aus der Zelle auszuschleusen. [54-56]

Eine weitere Besonderheit ist, dass in polarisierten Zellkulturen Galectin-3 überwiegend an der apikalen Seite der Zellen externalisiert wird. Die apikale Verteilung von Galectin-3 stimmt mit Untersuchungen von anderen Epithelien einschließlich Nierentubuli überein. Es ist nicht genau bekannt, über welche Signalwege dieser Vorgang gesteuert wird, doch dürften sie sich weitestgehend von denen der membranösen Glykoproteine unterscheiden. [49, 53, 57]

Innerhalb der Zelle kann über diverse Stimuli die Verteilung von Galectin-3 auf verschiedene intrazelluläre Kompartimente moduliert werden. Dabei hat sich gezeigt, dass neben der Lokalisation im Zytoplasma und im extrazellulären Milieu Galectin-3 auch im Nukleus vorkommt. So findet zum Beispiel unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren bei Fibroblasten eine Translokation in den Kern statt. Darüber hinaus konnte Galectin-3 ebenso an der mitochondrialen Membran nachgewiesen werden. Es besteht kein Konsens über die Mechanismen, die die Verteilung des Lektins innerhalb der einzelnen intrazellulären Kompartimente steuern und regulieren. Die Diskussion über die Bedeutung des N-terminalen Restes, des C-Terminus oder eventuell anderer Proteine, die mit Galectin-3 interagieren, ist kontrovers. [58-62]





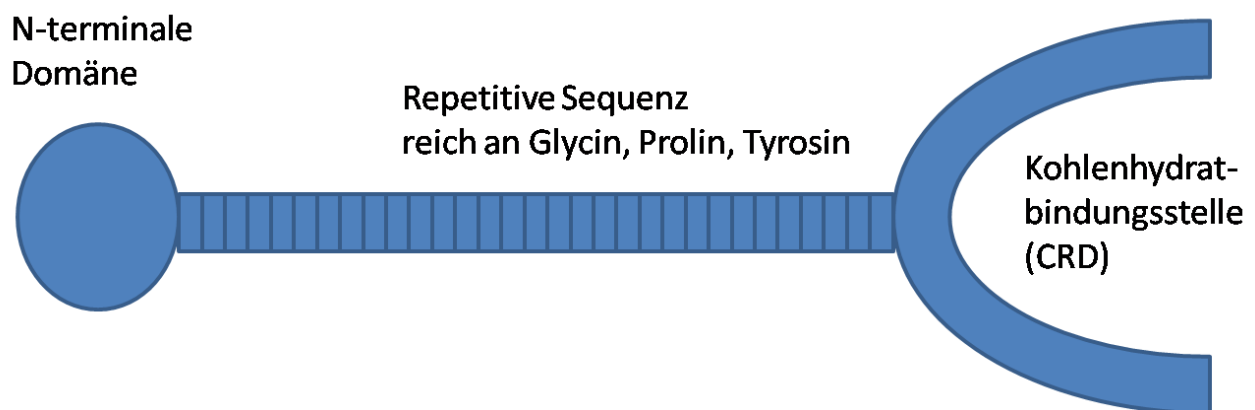
**Abbildung 4:** Sekretionsmechanismus von Galectin-3 in den Extrazellulärraum  
(modifiziert nach Cooper et al.[52])

### 1.3.2 Struktur von Galectin-3 und Bindungsspezifität

Während Galectin-1 und Galectin-2 Homodimere mit einer molekularen Masse von ca. 14,5 kDa pro Untereinheit bilden, kann Galectin-3, früher auch unter den Namen CBP-35, Mac-2, IgEBP, CBP-30, RL-29, L-29, L-31, L-34, LBL sowie zahlreichen weiteren bekannt, als Monomer isoliert werden. Das Molekulargewicht schwankt dabei je nach Spezies zwischen 26,2 kDa beim Menschen und 30,3 kDa beim Hund. Unter den Galectinen ist Galectin-3 aufgrund seiner chimären Struktur einzigartig. Es besteht aus einer C-terminalen Domäne, die die einzige Kohlenhydratbindungsstelle enthält, und aus einer N-terminalen Domäne. Diese beginnt mit einem konservierten Bereich aus 18 (12 nach Gong et al., 1999) Aminosäuren, dem ein an Glycin, Prolin und Tyrosin reicher Abschnitt folgt. Je nach Spezies weist dieser Wiederholungen mit einer variierenden Länge von 7 bis 10 Aminosäuren auf mit der Abfolge PGAYPG(X)<sub>1-4</sub>, wodurch sich die unterschiedliche molekulare Größe von Galectin-3 erklären lässt. Die repetitive Sequenz kann von Kollagenasen und Elastasen abgebaut werden, wohingegen die CRD sehr resistent gegenüber Proteolyse ist (Abbildung 5). [41, 43, 45, 48]

An der N-terminalen Domäne sind zwei Phosphorylierungsstellen lokalisiert, Ser 6 und Ser 12. Die Phosphorylierung wird hauptsächlich durch Kaseinkinase I katalysiert, wobei 90% an Ser 6 und lediglich 10% an Ser 12 stattfinden. Dabei wird die Bindungsstärke von Galectin-3 an Laminin um 85% reduziert. Dieser Vorgang ist jedoch vollständig reversibel und kann durch Dephosphorylierung mit Protein Phosphatase Typ I aufgehoben werden. [63-64]

Als erster Interaktionspartner von Galectin-3 konnte das Disaccharid Laktose (Gal- $\beta$ 1- $\rightarrow$ 4Glc) identifiziert werden. Des Weiteren ist das Kohlenhydratepitop der Blutgruppe A (GalNAc- $\alpha$ 1- $\rightarrow$ 3-[Fuc- $\alpha$ 1- $\rightarrow$ 2]-Gal- $\beta$ 1- $\rightarrow$ 4-Glc) ein hoch affiner Bindungspartner für Galectin-3. Zusammenfassend zeigt Galectin-3 eine Präferenz für substituierte sowie nicht-substituierte Polylaktosaminglykane. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass dieses Lektin eine hohe Affinität für die Membranglykoproteine von Lysosomen, Fibronectin und Laminin, die für ihren hohen Gehalt an Polylaktosaminglykanen bekannt sind, besitzt. [48, 65-67]



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung von Galectin-3

Mit seiner chimären Form besitzt Galectin-3 eine einzige CRD. Erstaunlicherweise ist dieses Lektin aber zu multivalenter Agglutination fähig. Zusätzlich bindet Galectin-3 ab einer Konzentration von  $> 0,1 \mu\text{M}$  an Laminin mit positiver Kooperativität. Diese multivalenten Bindungseigenschaften deuten auf die Fähigkeit hin, unter bestimmten Umständen Oligomere ausbilden zu können. Dies kommt dadurch zustande, dass die N-terminalen Bereiche der Proteinsequenz miteinander interagieren. Die C-terminale Domäne, die die CRD enthält, scheint weniger bedeutend zu sein, da nach Behandlung mit Kollagenase die residuale C-Domäne nicht mehr zur Oligomerisation

imstande ist. Dennoch schließen Barboni et al. nicht aus, dass es durch Flexibilität des N-Terminus bei Bindung an Glykoproteine zu einer Konformationsänderung kommt, die es ermöglicht, dass die CRD miteinander in Verbindung treten. Bestätigt wird diese Hypothese von Kuklinski et al., welche das homophile Bindungsverhalten von radioaktiv markiertem Galectin-3 analysierten. Dabei beschrieben sie, dass radioaktiv markiertes Galectin-3 mit immobilisiertem Galectin-3 interagiert. Wurde unmarkiertes Galectin-3 hinzugegeben, so erhöhte sich die Bindungsrate von markiertem Galectin-3. Im Gegensatz dazu wurde die Bindung durch die isolierte C-Domäne des Lektins ebenso wie durch das Disaccharid Laktose verhindert. Diese Daten sprechen für eine Beteiligung der CRD im homophilen Bindungsverhalten. [68-74] Um die Relevanz der Ausbildung von Oligomeren für die Funktion von Galectin-3 in vivo zu beurteilen, müssen der Kontext und die Umstände der Galectinexpression im menschlichen Organismus betrachtet werden. Indem einige Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen, Galectin-3 in großer Menge bilden und in der Lage sind, einen beträchtlichen Anteil in den Extrazellularraum abzugeben, können lokal höhere Konzentrationen entstehen, wodurch die Oligomerisation dieses Proteins einen wichtigen Beitrag zu seiner Funktion leisten könnte. [48]

### 1.3.3 Das Galectin-3-Gen

Das Galectin-3-kodierende Gen LGALS3 liegt auf dem Chromosomenabschnitt 14q21-22 und besteht aus 6 Exons und 5 Introns. Exon 1 bildet den größten Teil der Sequenz, die nicht translatiert wird und daher als Untranslated Region (UTR) bezeichnet wird. Exon 2 enthält den zweiten Abschnitt der UTR sowie die ersten 6 Aminosäuren des Proteins. Exon 3 beinhaltet die repetitive Sequenz am N-Terminus, wohingegen Exon 4 bis 6 für die CRD mit einer Länge von ungefähr 135 Aminosäuren kodieren. Der Transkriptionsstart von Gal-3 liegt inmitten einer großen CpG-Insel. Darunter versteht man einen DNA-Abschnitt, der besonders reich an den Dinukleotiden Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin ist. Diese Insel befindet sich zwischen -300 und +500 und es ist wahrscheinlich, dass dieser Bereich eine Rolle bei der Regulation der Galectin-3-Genexpression spielt, auch wenn es hierfür bisher noch keine entsprechenden experimentellen Daten gibt. Der Grund für diese Annahme ist, dass es Chiariotti et al. bei Fusionsexperimenten von Tumorzellen mit Leberzellen von Ratten gelang, die bis dahin ruhenden Rattenallele von Galectin-1 dauerhaft zu reaktivieren. Als Mechanismus, der die zellspezifische Expression und Reaktivierung

kontrolliert, fanden sie, dass 11 um den Transkriptionsstart liegende CpG-Stellen von einem vollständig methylierten Zustand in einen komplett demethylierten Zustand wechselten. Zudem konnten weitere Experimente bestätigen, dass der Methylierungsgrad in hohem Maß mit der Transkriptionsaktivität korreliert. Werden diese Erkenntnisse auf Galectin-3 übertragen, so könnte auch hier das Ausmaß der Methylierung eine entscheidende Rolle bei der Genexpression von Galectin-3 spielen. Der Promotor von Galectin-3 ist funktionell charakterisiert und der Genregion von -339 bis +141 wird eine solche Promotoraktivität zugeschrieben. Außerdem steigt die Proteinexpression rasant nach Serumstimulation an. Diese Regionen, die sensibel auf die Zugabe von Serum reagieren, sind zwischen -513 und -339 sowie zwischen -339 und -229 anzusiedeln. Da jedoch diesen Regionen die typische Sequenz fehlt, die den Kern der Bindungsstelle für das Serum-responsible Element bildet, wird vermutet, dass andere Elemente in der Promotorregion wie cAMP Responsive Element (CRE) und Sis Inducible Element (SIE) diese Aufgabe übernehmen. Zusätzlich besitzt das zweite Intron Promotoraktivität, die jedoch normalerweise, wie von Raimond et al. beschrieben wurde, von p53 supprimiert wird. Kommt es aber zu einer Mutation von p53, so fällt dieser inhibierende Faktor weg. [75-77]

### **1.3.4 Funktion von Galectin-3**

Der Nachweis von Galectin-3 in einer Vielfalt von unterschiedlichen Gewebetypen und Zellarten deutet darauf hin, dass Galectin-3 nicht eine bestimmte Funktion zugeteilt werden kann, sondern vielmehr, dass es an vielen verschiedenen Vorgängen sowohl intra- als auch extrazellulär in diversen biologischen Systemen beteiligt ist. Indem Galectin-3 mehrere Kohlenhydratmuster auf unterschiedlichen Glykoproteinen erkennen kann, eignet es sich in besonderer Weise, einen modulierenden Einfluss auf biologische Effekte auszuüben. [48]

Im Allgemeinen besitzt Galectin-3 antiapoptotische Effekte, die jedoch ausschließlich durch intrazelluläres Galectin-3 vermittelt werden, während bei extrazellulärem Galectin-3 eine proapoptotische Wirkung beobachtet werden konnte. Im Rahmen der Apoptose reichert sich Galectin-3 an der mitochondrialen Membran an und verhindert dort eine Membranschädigung mit anschließender Cytochrom-C-Freisetzung. Die Interaktion von Galectin-3 mit Synexin, einem Mitglied der Annexinfamilie, scheint dabei ein wichtiger Aspekt zu sein, da eine Herabregulation von Synexin die

Translokation von Galectin-3 und damit seine antiapoptotische Eigenschaft inhibiert. Innerhalb der CRD enthält Galectin-3 ein NWGR-Motiv (Asn-Trp-Gly-Arg) an Position 180-184. Mutationen in diesem Bereich können die antiapoptotische Wirkung von Galectin-3 aufheben, wodurch auf die fundamentale Bedeutung des NWGR-Motivs geschlossen werden kann. [61]

#### **1.3.4.1 Galectin-3 in Fettgewebe und Immunzellen**

Im Rahmen immunologischer Reaktionen ist Galectin-3 ein wichtiger Bestandteil. Nicht nur, dass es in vielen Zellen wie zum Beispiel Monozyten, Neutrophilen, Mastzellen und Fibroblasten nachgewiesen werden kann, auch zu Differenzierungs- und Aktivierungsvorgängen sowie komplexen interzellulären Interaktionen leistet Galectin-3 einen wichtigen Beitrag. Das besondere Augenmerk soll sich hier auf den Einfluss von Galectin-3 auf Monozyten richten. Dies wird in einem folgenden Abschnitt separat illustriert.

Bei neutrophilen Granulozyten bewirkt Galectin-3 eine Steigerung der Zytotoxizität mittels  $O_2^-$ -Produktion und damit eine Aktivierung dieser Zellen. Neben der Bedeutung der CRD fanden Yamaoka et al., dass auch das Vorhandensein der N-terminalen Domäne hierfür essentiell ist. Die Oligomerisierung von Galectin-3 und damit verbunden die Quervernetzung von glykosylierten Membrankomponenten ist wahrscheinlich entscheidend, um Neutrophile zu aktivieren. [78] In B-Lymphozyten sichert Galectin-3 als intrazellulärer Mediator das Überleben aktivierter Zellen und reguliert das Entstehen von Gedächtniszellen. Des Weiteren inhibiert es eine überschießende Bildung von Plasmazellen. [79] Da Galectin-3 ein hochaffiner Ligand des Ig E-Rezeptors ist, kann es über Quervernetzung Mastzellen aktivieren und so deren Degranulation bewirken. [80] Ein wesentlicher Aspekt bei immunologischen Reaktionen jeder Art ist die Fähigkeit von Immunzellen, mit Komponenten der extrazellulären Matrix, aber auch mit anderen Zellen zu interagieren. An beiden Vorgängen ist Galectin-3 beteiligt. Zum einen ist es in der Lage an Laminin, einen ubiquitär vorkommenden Bestandteil des Extrazellularraums, zu binden, zum anderen vermittelt es die Bindung an Endothelzellen, wodurch Zellen wie Makrophagen, die Galectin-3 an ihrer Oberfläche exprimieren, eine Möglichkeit besitzen, mit ihrer Umgebung in Wechselwirkung zu treten. [81-82]

Nachdem auch Adipositas, wie bereits oben erwähnt, im weiteren Sinne als eine Form chronischer Entzündung aufgefasst werden kann, ist es von großem Interesse,

die Rolle von Galectin-3 im Fettgewebe zu betrachten. Galectin-3 konnte sowohl im murinen als auch im menschlichen Fettgewebe nachgewiesen werden. Im Tiermodell wurde Galectin-3 bei Gewichtszunahme durch Hochfettdiät auf mRNA- und auf Proteinebene im Fettgewebe hochreguliert. Ebenso konnte im Mesangium eine Zunahme unter diabetischer Stoffwechsellage gezeigt werden. Das Fehlen von Galectin-3 ist im Tiermodell mit einer gesteigerten Vulnerabilität gegenüber diabetischer Glomerulopathie assoziiert. Beim Menschen findet sich Galectin-3 überwiegend in den Präadipozyten, während der Anteil in den Adipozyten nur gering ausfällt. Exogen zugeführtes Galectin-3 stimuliert über die CRD des Lektins die Zellproliferation in Präadipozyten sowie die DNA-Synthese dosisabhängig und fördert die Differenzierung von Präadipozyten zu lipidbeladenen Adipozyten, so dass Galectin-3 eine Funktion in der Fettspeicherung und der Entstehung von Adipositas haben könnte. [83-86]

#### **1.3.4.2 Galectin-3 und Monozyten**

Monozyten stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab und zirkulieren mehrere Tage im Blut, bevor sie in den Extravaskularraum emigrieren und zu Makrophagen ausdifferenzieren. Die Differenzierung zu Gewebsmakrophagen ist von verschiedenen phänotypischen Veränderungen begleitet, die je nach funktionellem Zustand der Zellen und dem auslösenden Reiz stark variieren können. [48]

Galectin-3 wird in Monozyten des peripheren Blutes exprimiert und steigt drastisch an, sobald die Monozyten zu Makrophagen differenzieren. So belegten Liu et al. anhand von Western Blots in Zelllysaten einen fünffachen Anstieg am Tag eins und einen zwölffachen am Tag fünf nach Beginn der Differenzierung. Am komplexen molekularen Regulationsmechanismus scheinen dabei Signaltransduktionswege über Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) und Proteinkinase C beteiligt zu sein. Auch an der Zelloberfläche nahm die Menge an Galectin-3 dabei zu. Der Grund dafür liegt möglicherweise an Veränderungen des Glykosylierungsstatus der Plasmaproteine im Rahmen von Umbauvorgängen der Membran, wodurch die Affinität für Galectin-3 steigt. Während des Differenzierungsprozesses ist Galectin-3 interessanterweise sehr prominent im Kern vertreten, wie es vor allem bei proliferierenden Zellen beschrieben ist. Eine Zunahme der Galectin-3-Expression konnte auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden, wobei die gesteigerte mRNA-

Menge nicht auf eine vermehrte Transkription, sondern auf eine posttranskriptionelle Veränderung der mRNA-Stabilität zurückzuführen ist. [44, 48, 87-89]

Geht man davon aus, dass aus Monozyten neu rekrutierte Makrophagen ihren Weg vom Blutstrom zum Zielort finden müssen, so ist im Rahmen der Zunahme der Oberflächenexpression von Galectin-3 die Tatsache interessant, dass ein Besetzen der  $\alpha$ -Galaktosyl-Bindungsstellen auf der Makrophagenmembran zu einer Veränderung des Sekretionsverhaltens führt. So verringert sich die Sekretion von Fibronektin und Transglutaminase, wohingegen die Freisetzung von Plasminogen Activator Inhibitor Typ 2 (PAI-2) steigt. Außerdem werden Kollagenasen und TNF- $\alpha$  vermehrt sezerniert. Dies führt zu der Annahme, dass durch diese Faktoren der Umsatz der extrazellulären Matrix moduliert wird. [90-91]

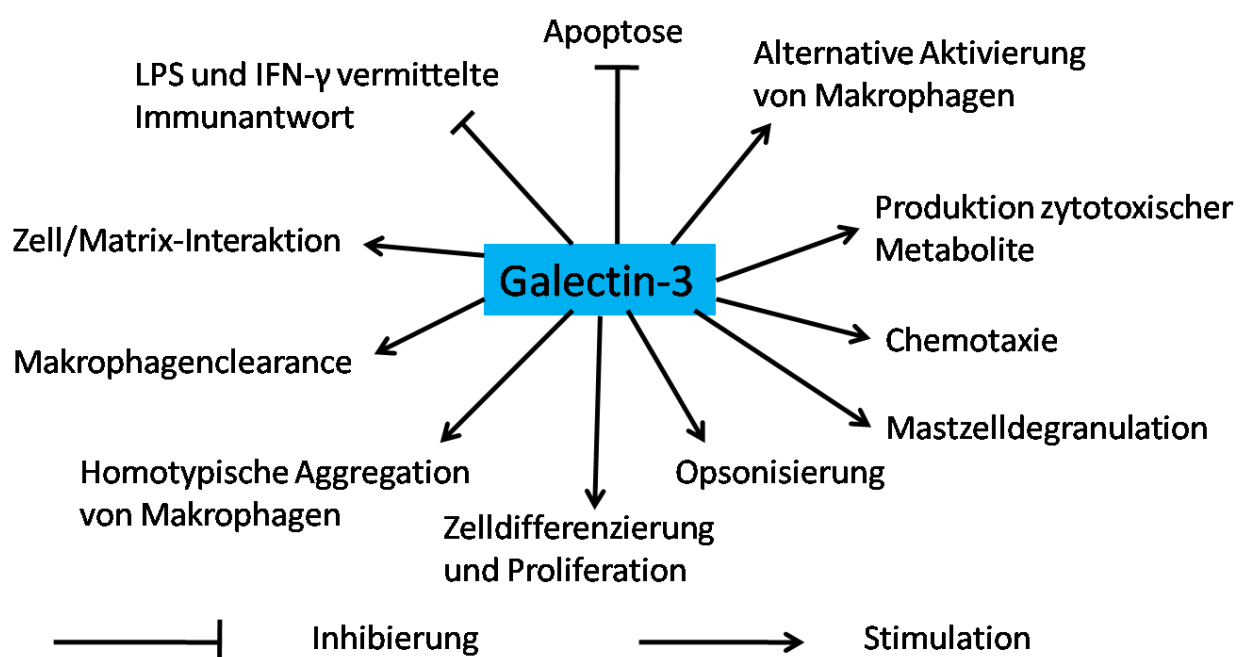
Werden Monozyten durch Substanzen wie LPS und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) aktiviert, so hat dies eine drastische Reduktion des Gesamtgalectin-3 um 40% zur Folge. [87] Zudem konnten Sato et al. bei mit Thioglykol stimulierten Makrophagen von Mäusen eine signifikante Reduktion der Oberflächenexpression von Galectin-3 erkennen, was sie auf eine Verringerung der Bindungsstellen an der Zelloberfläche zurückführten. [50] Ein weiterer Aspekt von Galectin-3 ist, dass es an LPS bindet und die LPS induzierte inflammatorische Antwort supprimiert. Im Mausmodell konnte sowohl bei Galectin-3<sup>-/-</sup>-Makrophagen als auch nach Blockieren von Galectin-3 mit Antikörpern oder Laktose die LPS induzierte Signalkaskade vermehrt aktiviert und eine erhöhte Produktion inflammatorischer Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) beobachtet werden, was zu einer gesteigerten Schockanfälligkeit und zu einer signifikant höheren Mortalität führte. Es ist daher anzunehmen, dass Galectin-3 dazu beiträgt, vor einer überschießenden Immunreaktion zu schützen, indem es die LPS-Antwort negativ reguliert. [92]

Außer der klassischen Makrophagenaktivierung durch LPS und IFN- $\gamma$  können Makrophagen auf einem alternativen Weg mittels IL-4 und IL-13 aktiviert werden. Abgesehen von den Mediatoren unterscheiden sich die beiden Wege auch funktionell voneinander. Während die klassische Aktivierung vor allem bei akuten Infektionen eine Rolle spielt, ist der alternative Weg an der Resolutionsphase entzündlicher Prozesse beteiligt. Galectin-3 ist bei der Signalkaskade der alternativen Aktivierung von Makrophagen durch Bindung an CD98, einem 125 kDa heterodimeren Typ II Transmembranprotein, und damit verbundener Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) von größter Bedeutung. So stimuliert IL-4 die

Galectin-3-Expression und -Freisetzung zusammen mit anderen phänotypischen Markern der alternativen Makrophagenaktivierung. Sowohl mit siRNA gegen Galectin-3 als auch mit spezifischen Inhibitoren der CRD wird die alternative Aktivierung aufgehoben. Dagegen führt exogenes Galectin-3 sowie die Quervernetzung von CD98 durch Antikörper zur vermehrten Aktivierung. In Gal-3 knock out Mäusen ist keine Veränderung der klassischen Aktivierung von Makrophagen zu beobachten, während der alternative Weg eingeschränkt ist. [93]

Betrachtet man nun, welchen Einfluss lösliches Galectin-3 seinerseits auf das zytotoxische Verhalten von Monozyten hat, so ergibt sich, dass Galectin-3 die Hyperoxidproduktion dieser Zellen steigert. Durch den Zusatz von Laktose kann der Effekt aufgehoben werden, was darauf schließen lässt, dass dieser über die CRD des Lektins vermittelt wird. [87] Außerdem wirkt Galectin-3 als Chemokin positiv chemotaktisch auf Monozyten und Makrophagen und induziert dosisabhängig die Migration von Monozyten. [94] Darüber hinaus besitzt dieses Lektin eine opsonisierende Wirkung und vermag die Makrophagenclearance zu erhöhen. [95]

Auch im Rahmen der homotypischen Aggregation von Monozyten, ein Ausdruck für zelluläre Reifung und Aktivierung, hat Galectin-3 eine Schlüsselfunktion, indem es durch Bindung an CD13 einen Integrin unabhängigen Mechanismus zur Zellaggregation auslöst. [96]



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Funktionen von Galectin-3



Die Tatsache, dass Galectin-3 sowohl von vielen Zellen des Immunsystems gebildet wird, als auch an verschiedenste glykosylierte Moleküle binden und damit Zell-Matrix-Interaktionen [82], Quervernetzung von Membranproteinen [80] und Zellen [96] ermöglichen kann, macht Galectin-3 zu einem wichtigen Bestandteil inflammatorischer und immunologischer Reaktionen. Dies wird besonders am Beispiel der Monozyten deutlich.

#### **1.4 Aufgabenstellung**

Adipositas kann gemessen durch den Anstieg von Entzündungsmediatoren wie CRP und IL-6 als eine Form chronischer Entzündung angesehen werden. [7-8] Hierbei kommt auch den Makrophagen, deren Population und Zytokinproduktion bei Übergewicht ansteigt, eine tragende Rolle zu. [8-10] In der Pathogenese der Insulinresistenz und des Typ 2 Diabetes mellitus kann Adipositas als Ursache für deren Entstehung sowie daraus resultierenden Folgeerkrankungen wie Atherosklerose betrachtet werden. Das Adipokin Adiponectin, dem eine antidiabetische und antiatherosklerotische Wirkung zugeschrieben wird, ist bei Adipositas, Typ 2 Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen erniedrigt. [20, 97] Im Gegensatz dazu scheint das Fehlen von Galectin-3, einem wesentlichen Regulator inflammatorischer und immunologischer Reaktionen, einen positiven Einfluss auf den inflammatorischen Prozess im Rahmen von Diabetes und Atherosklerose auszuüben. So ist die Abwesenheit von Galectin-3 im Mausmodell mit einer reduzierten Anzahl an atherosklerotischen Plaques und einer verringerten perivaskulären Entzündung assoziiert. [98] Ebenso sind Mäuse mit einem Mangel an Galectin-3 weitestgehend resistent gegen einen durch Streptozotocin ausgelösten Diabetes. [99] Zudem finden sich in instabilen atherosklerotischen Plaques höhere Galectin-3-Werte als in stabilen. [100] Da in diesem Zusammenhang die Expression von Galectin-3 in Monozyten von Patienten mit Diabetes Typ 2 und die Regulation dieses Proteins durch Hormone, die unter Insulinresistenz verändert sind, bisher nicht untersucht wurde, war es Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Adiponectin auf Galectin-3 in Monozyten zu analysieren und endogene und exogene Galectin-3-Werte in Monozyten von Typ 2 Diabetikern sowie geeigneten Kontrollen zu bestimmen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Agarosegelkammer (12 x 14 cm) und Zubehör	Peqlab
Analysenwaage BP 221 S	Sartorius
Analysenwaage PT-1200	Sartorius
Autoklav Varioklav Dampfsterilisator	H + P
Automixer II Plus	Kodak
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik
Drucker für Geldokumentation DGP UP-D890	Sony
Eismaschine ZBE 150	Ziegra
ELISA-Reader	Molecular Devices
Entwickler M35 X-Omat Prozessor	Kodak
Erdgasbrenner	Bochem
Geldokumentation	MWG-Biotech
Inkubationsschrank 37°, 5% CO <sub>2</sub>	Heraeus Instruments
Inkubationsschrank mit Umlaufschüttler S150	Stuart
LightCycler® LC Karussell Zentrifuge	Roche
LightCycler® Real-Time RT-PCR mit Zubehör	Roche
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec
Magnetrührer MR 3000 D	Heidolph
Magnetrührer/Heizplatte MR 3001 K	Heidolph
MidiMACS™ Separator quadro	Miltenyi Biotec
Mikroskop und Zubehör	Nikon
Milli-Q Biocell	Millipore
PCR Cycler T-Gradient Thermocycler	Biometra
pH-Meter 764 Multi-Calimatic	Knick
Pipettensatz	Eppendorf
Power Supply E445	Consort
Power Supply E835	Consort
Power Supply Power Pac 200	BIORAD
Schüttler 3013	GFL
Schüttler HS 501 digital	IKA Labortechnik
Schüttler IKA-Vibrax-VRX	Janke und Kunkel
SDS-Gelapparatur Minigel und Zubehör	BIORAD

---

SDS-Gelplatten und Zubehör	BIORAD
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments
Sterilisator WTC	Binder
Thermoblock TB 1	Biometra
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
Ultraschallgerät mit Power Supply	Bandelin
UV/Vis Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia
UV-Flächenstrahler TFX-20 M	MWG-Biotech
Vakuumpumpe	KNF Laboport
Vortex VF2	Janke und Kunkel
Vortex Typ 54117 Reax 1 D R	Heidolph
X-Ray Filmkassette (18 x 24 cm)	Siemens
Zellzählkammer, Tiefe 0,1 mm	Neubauer
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments
Zentrifuge RC 5C Plus	Sorvall
Zentrifugenrotor SS34, SLA-1500	Sorvall

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Absaugpipette (5 ml)	BD Falcon®
Dialyseschlauch (29 mm)	Serva
ELISA-Platte (96 Loch)	Corning Costar®
Gel Blotting Papier Whatman®	Schleicher & Schuell
Hyperfilm ECL™	Amersham Biosciences
Immun-Blot™ PVDF Membran (0,2 µm)	BIORAD
Konische Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Falcon®
LightCycler® Kapillaren (20 µl)	Roche
MACS CD14 Micro Beads	Miltenyi Biotec
MACS LS magnetische Separationssäulen	Miltenyi Biotec
Parafilm	American National Can™
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf
Safety-Multifly- Set	Sarstedt
Serologische Einwegpipetten (5 ml, 10 ml)	Sarstedt
S- Monovette 4 ml (1,6 mg EDTA / ml Blut)	Sarstedt
Steriflip® (50 ml, 0,22 µm Porengröße)	Millipore

---

Sterile Einmalspritzen	BD Falcon®
Sterile Filter-Spitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Biozym Diagnostik
Sterile Kanülen	BD Microlance™
Sterile Membran-Adapter	Sarstedt
Vacutainer®CPT™ (8 ml)	Becton Dickinson (BD)
Vacutainer Systems Safety-Lok™ Blood Collection Set	Becton Dickinson (BD)
Vacutainer Systems PrecisionGlide™ (0,8 bzw. 0,9 x 38 mm)	Becton Dickinson (BD)
Vakuum Sterilfiltrationssystem (500 ml, 1000 ml)	Millipore
Zell Schaber (16 cm, 25 cm)	Sarstedt
Zellkulturplatten (6-Loch) Flat Bottom Cell+	Sarstedt

### 2.1.3 Chemikalien

Acrylamidlösung (40%)	BIORAD
Adiponectin	R&D Systems
AICA – Ribosid	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS) (10%)	BIORAD
Bicinchoninsäure	Sigma
Bisacrylamidlösung (2%)	BIORAD
Bromphenolblau	Sigma
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roche
CaCl <sub>2</sub>	Fluka
CD 14 Beads	Miltenyi Biotec
Chloroform	Merck
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Desoxycholate	Sigma
Desoxynukleosid-Triphosphat-Set	Roche
DNA-Leiter, 1 kb	Invitrogen
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
EDTA	Merck
FCS	Biochrom
Full Range Rainbow™ Proteinstandard	Amersham Biosciences
Glyzerin	Merck
Glyzin	Merck
Igepal	Sigma
In Solution Compound C	Calbiochem
Kupfer(II)sulfat	Sigma

---

Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma
Magermilchpulver	Vitalia
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Metformin	Sigma
Methanol, technisch	Chemikalienausgabe
Natriumazid	Fluka
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Nukleasefreies Wasser	Promega
Ölsäure	Sigma
Palmitinsäure	Sigma
PBS	Gibco
2-Propanol	Merck
p38 MAPK Inhibitor SB 203580	Calbiochem – Merck
RPMI 1640	PAN
Salzsäure rauchend	Merck
Schwefelsäure rauchend	Merck
SDS	Merck
Softasept® N	Braun
TEMED	Merck
Thromborel® S	Roche
Tris-NH <sub>3</sub>	Merck
Tris-HCl	Merck
Trizol	Invitrogen
Tween® 20	Sigma
Xylencyanol	Merck

## 2.1.4 Antikörper

### 2.1.4.1 Primäre Antikörper

Anti- Human Galectin-3 monoklonaler Antikörper	Becton Dickinson
Anti- GAPDH monoklonaler Antikörper	New England Biolabs GmbH

### 2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen Peroxidase-konjugierter Antikörper	Jackson Immuno Research
Anti-Maus Peroxidase-konjugierter Antikörper	Jackson Immuno Research

### 2.1.5 Kit-Systeme

DuoSet® ELISA Development System human Adiponectin	R&D Systems
ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	Amersham Bioscience
Human Galectin-3 BMS279/2CE	Bender MedSystems
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
Reverse Transcription System	Promega
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Streptavidin-HRP	R&D Systems
Substrate Reagent Pack	R&D Systems

### 2.1.6 Puffer und Lösungen

Im Folgenden wird die Zusammensetzung aller selbst hergestellten Puffer und Lösungen aufgeführt. Die Lagerung erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

#### 2.1.6.1 Lösungen für Arbeiten mit Proteinen

##### 2.1.6.1.1 Lösungen für die Herstellung von Proteinextrakten

###### RIPA-Lysepuffer:

NaCl, 3 M Stammlösung	2,5	ml
Igepal	500	µl
Desoxycholate	0,25	g
SDS, 20%ige Stammlösung	250	µl
Tris, 1 M Stammlösung pH 7,5	2,5	ml
	ad 50	ml ddH <sub>2</sub> O

Vor Gebrauch wurde pro 10 ml RIPA-Puffer eine Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail frisch zugesetzt. Der Puffer wurde bei 4°C höchstens zwei Wochen gelagert.

##### 2.1.6.1.2 Lösungen für SDS-PAGE

###### SDS-Probenpuffer (2 x Lämmli), 2-fach:

Glyzerin (87 %)	2	ml
Tris-HCl, 1 M Stammlösung pH 6,8	120	µl
SDS, 20%ige Stammlösung	2	ml
β-Mercaptoethanol	1	ml
Bromphenolblau	0,025	g
	ad 10	ml ddH <sub>2</sub> O

Der SDS-Probenpuffer wurde im Verhältnis 1:1 mit der jeweiligen Probe vermischt.

**SDS-Gellaufpuffer, 10-fach:**

Glyzin	144	g
Tris-NH <sub>3</sub>	30	g
SDS, 20%ige Stammlösung	50	ml
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

**Lösung für 15%ige Trenngele:**

Acrylamid 40%	30,0	ml
Bisacrylamid 2%	3,4	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 8,7	10,0	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,4	ml
ddH <sub>2</sub> O	32,0	ml

**Lösung für 10%ige Trenngele:**

Acrylamid 40%	15,0	ml
Bisacrylamid 2%	3,4	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 8,7	7,5	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,3	ml
ddH <sub>2</sub> O	28,5	ml

**Lösung für 5%ige Sammelgele:**

Acrylamid 40%	5,0	ml
Bisacrylamid 2%	2,6	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 6,8	5,0	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,2	ml
ddH <sub>2</sub> O	24,0	ml

Die Acrylamidlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt. Unmittelbar vor dem Gießen des Trenn- bzw. Sammelgels wurde der Acrylamidlösung 10%ige APS-Lösung im Verhältnis 1:167 und TEMED im Verhältnis 1:334 zugegeben.

**2.1.6.1.3 Lösungen für Western Blot****Tank-Puffer, 10-fach:**

Glyzin	140	g
Tris-NH <sub>3</sub>	30	g
SDS	5	g
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

**Wettransfer-Puffer:**

Methanol (technisch)	200	ml
Tank-Puffer, 10-fach	80	ml
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

**PBST:**

Tween® 20	1	ml
	ad 1	l PBS

**Blockierlösung:**

Magermilchpulver	5	g
	ad 100	ml PBST

Die Blockierlösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

**BSA-PBST:**

BSA	7,5	g
Natriumazid	0,5	g
Tween® 20	0,5	ml
	ad 0,5	l PBS

Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt. Die primären Antikörper wurden in dieser Lösung im Verhältnis 1:1000 verdünnt.

**2.1.6.1.4 Lösungen für Galectin-3-ELISA****Waschpuffer:**

Waschpufferkonzentrat	50	ml
ddH <sub>2</sub> O	950	ml

**Assay Buffer:**

Assay Buffer Konzentrat	5,0	ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 95	ml

**Verdünnung des Biotin-Konjugats:**

Biotin-Konjugat	0,06	ml
ddH <sub>2</sub> O	5,94	ml

**Standard:**

Standard in ddH<sub>2</sub>O mit der auf dem Standardetikett angegebenen Menge lösen.

**Sample Diluent:**

Gebrauchsfertig

**Verdünnung der Streptavidin-HRP:**

Streptavidin-HRP	0,030	ml
ddH <sub>2</sub> O	11,970	ml

**TMB-Substratlösung:**

Gebrauchsfertig

**Stopplösung:**

Gebrauchsfertig



### 2.1.6.1.5 Lösungen für Adiponectin-ELISA

**Waschpuffer:**

Tween® 20	0,5	ml
	ad 1	l PBS

**Reagent Diluent:**

BSA	5	g
	ad 0,5	l PBS

Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

**Substratlösung:**

Die Lösungen A und B (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) des Substrate Reagent Pack von R&D Systems wurden im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt.

**Stopplösung:**

Schwefelsäure rauchend	9,8	g
	ad 50	ml ddH <sub>2</sub> O

**Verdünnung der Antikörper:**

Capture AK wurden laut Protokoll in PBS, Detection AK in Reagent Diluent verdünnt.

**Verdünnung des HRP-Streptavidin-Konjugats:**

HRP-Streptavidin-Konjugat wurde laut Packungsbeilage in Reagent Diluent verdünnt.

### 2.1.6.2 Lösungen für die Isolation primärer humaner Monozyten

**CD14 Beads Puffer:**

BSA	0,5	g
EDTA, 0,5 M Stammlösung pH 8,0	2,0	ml
	ad 0,5	l PBS

Der CD14 Beads Puffer wurde steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

### 2.1.7 Primer für LightCycler-Analysen

Die Primer für die LightCycler Expressionsanalysen wurden jeweils zu beiden Seiten eines Introns gewählt, um die Amplifizierung genomischer DNA zu vermeiden. Eine Länge der amplifizierten Fragmente von etwa 300 bp garantierte möglichst kurze Elongationszeiten. Außerdem wurden die Primer so entworfen, dass die Annealing-Temperatur etwa 60°C betrug. Die Spezifität der Primer wurde durch Sequenzierung der PCR-Produkte verifiziert.

---

<b>Oligonukleotid</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
<b>β-Actin</b>	
β-Actin_uni	CCAGGGTGTGATGGTGGGAATG
β-Actin_rev	CGCACGATTTCCCTCTCAGCTC
<b>Galectin-3</b>	
Galectin-3_uni	TGTTTGCAATACAAAGCTGGA
Galectin-3_rev	TGGTGAGGTCTATGTCACCAGA

### **2.1.8 Rekombinantes Adiponectin**

Zur Stimulation der primären Monozyten wurde zum einen hochmolekulares Adiponectin der Firma R&D Systems und zum anderen in der Arbeitsgruppe mit Hilfe von Insektenzellen hergestelltes, trimeres Adiponectin verwendet. Zur Herstellung des niedermolekularen, trimeren Adiponectins wurde die cDNA von Adiponectin mit Hilfe von Baculoviren in H5-Insektenzellen eingeschleust, von diesen exprimiert und anschließend aus den Überständen gereinigt. [23]

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Erweiterung einer EDTA-Plasma-Bank männlicher Typ 2 Diabetiker und geeigneter Kontrollen**

Das Studienprotokoll wurde von der lokalen Ethikkommission geprüft und stimmt mit den Vorgaben der Deklaration von Helsinki (1997) überein. Jeder Proband wurde über das Projekt aufgeklärt und unterschrieb eine Einverständniserklärung.

Erstellt wurden drei Kollektive, die sich folgendermaßen zusammensetzen: Typ 2 Diabetiker, Kontrollen mit einem Body Mass Index (BMI) unter  $25 \text{ kg/m}^2$  (NW) und Kontrollen mit einem BMI über  $25 \text{ kg/m}^2$  (OW). Im Folgenden wird das Kollektiv der Probanden mit einem BMI  $< 25 \text{ kg/m}^2$  als normalgewichtige Kontrollgruppe und das der Probanden mit einem BMI  $> 25 \text{ kg/m}^2$  als übergewichtige Kontrollgruppe bezeichnet.

Den Probanden wurden jeweils 4 ml EDTA-Plasma mit S-Monovetten der Firma Sarstedt abgenommen. Anschließend wurde das Plasma in der Zentrifuge bei 3900 rpm für 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Der vom Blutkuchen abgenommene Plasmaüberstand wurde aliquotiert und getrennt vom Blutkuchen bei  $-20^\circ\text{C}$  zur weiteren Verwendung eingefroren.

### **2.2.2 Isolation humaner peripherer Monozyten aus Vollblut**

Ein bereits in der Arbeitsgruppe angelegtes Kollektiv von Monozyten, isoliert aus dem Vollblut von Typ 2 Diabetikern, normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen, wurde erweitert. Zur Gewinnung der Monozyten wurden den Probanden jeweils circa 50 ml Vollblut mit Hilfe von Vacutainern entnommen.

Es wurden primäre Monozyten für Zelllysate aus dem Vollblut von 7 männlichen Probanden mit Diabetes mellitus Typ 2, von 10 männlichen, übergewichtigen und 10 männlichen, normalgewichtigen Kontrollen isoliert. Details dieser Studiengruppe sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Des Weiteren wurden Monozyten zur Gewinnung von Überständen von 23 männlichen Typ 2 Diabetikern, von 20 männlichen, übergewichtigen Kontrollen und 20 männlichen, normalgewichtigen Kontrollen gesammelt. Das Durchschnittsalter der Typ 2 Diabetiker liegt bei 60 Jahren mit einer Verteilung von 42 bis 81 Jahren. Das mittlere Alter der übergewichtigen Kontrollen beträgt 56 Jahre mit einer Verteilung

von 40 bis 75 Jahren. Die normalgewichtigen Kontrollen haben ein mittleres Alter von 62 Jahren mit einer Verteilung von 49 bis 73 Jahren. Diese Gruppe enthält auch die Probanden, die in Tabelle 1 aufgeführt sind. Weitere Details sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Die mit jeweils 8 ml Vollblut gefüllten Vacutainer wurden direkt nach der Blutentnahme mehrmals invertiert, um das Natriumcitrat in den Röhrchen mit dem Blut zu vermischen und eine Gerinnung zu verhindern. Anschließend wurden die Vacutainer bei 2900 rpm für 25 min bei RT zentrifugiert. Durch diesen Zentrifugationsschritt und das Polyestergel in den Vacutainern wurden die Blutbestandteile gemäß ihrer Dichte separiert: Schwere Bestandteile, vor allem aber Erythrozyten, wurden am Boden des Röhrchens zurückgehalten, während leichtere Bestandteile, wie etwa das Plasma und mononukleäre Zellen, sich nun über der Gelschicht befanden. Die Vacutainer wurden anschließend abermals 5-6-mal invertiert und unter der Sterilbank geöffnet. Plasma und mononukleäre Zellen eines Spenders wurden abgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde anschließend bei 1200 rpm für 15 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 20 ml PBS gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (1200 rpm, 10 min, RT). Das Plasma wurde jeweils auf vier Eppendorfcups zu je 1 ml aufgeteilt; der Rest wurde in 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Schließlich wurde das gesamte Plasma bei -20°C gelagert. Das Zellpellet wurde in 2 ml CD14-Beadspuffer resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und einem weiteren Zentrifugationsschritt unterzogen (1200 rpm, 10 min, RT). Anschließend wurde das Pellet in CD14-Beadspuffer (160 µl pro 6 Vacutainer) resuspendiert und mit CD14-Beads (40 µl pro 6 Vacutainer) für 20 min bei 4°C inkubiert. Während dieser Inkubationsphase wurde das Eppendorfcup alle 5 min angeschnippt, um eine gute Durchmischung von Beads und Zellen zu gewährleisten. Dabei konnten sich die an die magnetischen Beads gekoppelten monoklonalen CD14-Antikörper an das Oberflächenprotein CD14, das vor allem von Monozyten exprimiert wird, anlagern.

Die so markierten Monozyten konnten nun durch ein magnetisches Feld von anderen Zellen separiert werden. Hierzu wurde nach der Inkubation 1 ml CD14 Beadspuffer zur Zellsuspension hinzugegeben und diese bei 1200 rpm erneut 10 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich in 2 ml CD14-Beadspuffer aufgenommen. Als nächster Schritt wurden in einen Magneten LS Säulen eingespannt, die mit

jeweils 3 ml CD14 Beadspuffer äquibriert wurden. Anschließend wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension auf eine Säule gegeben und dreimal mit je 3 ml CD14 Beadspuffer gewaschen. Danach wurden die Monozyten eluiert: Hierzu wurden die Säulen nacheinander vom Magneten abgenommen und in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen gestellt. Die Elution der Monozyten erfolgte mit 5 ml CD14 Beadspuffer. Schließlich wurden die monozytären Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, RT) und der Überstand verworfen.

Ein 10 µl Aliquot wurde verwendet, um die Zellzahl in der Neubauer Zellzählkammer zu ermitteln. Die Ausbeute lag bei ca. 1 - 1,5 Millionen Monozyten pro Vacutainer. Die Zellen wurden in RPMI Medium mit 10% autologem Serum (3 Mio/Loch) in 6-Loch Platten kultiviert.

Zur RNA-Isolierung wurden die Monozyten in 300 µl Trizol aufgenommen und schließlich bei -80°C gelagert; für das Arbeiten mit Proteinen wurde das Zellpellet in 50 µl RIPA resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

### **2.2.3 Herstellung von autologem Serum**

Für die Durchführung von in vitro Experimenten mit Monozyten wurde autologes Serum benötigt, das aus Plasma hergestellt wurde. Das Plasma wurde während der Monozyten-Isolation gewonnen (s. oben).

Vorab wurde PBS auf 4°C gekühlt. Außerdem wurde Thromborel S in 10 ml Wasser gelöst und für mindestens 30 min bei 37°C gelagert.

Zum Plasma im 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden schließlich sowohl eine Spatelspitze Calciumchlorid als auch das gelöste Thromborel S (1%) gegeben. Es folgte eine Inkubation des Plasmas für 10 min bei 37°C. Anschließend wurde mit einer Pasteurpipette das Gerinnungsprodukt von der Innenwand des Zentrifugenröhrchens gelöst und für 30 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen Dialyseschlauch überführt und zwei Stunden gegen das gekühlte PBS dialysiert; nach PBS-Wechsel erfolgten zwei weitere Dialyseschritte über ebenfalls je zwei Stunden. Abschließend wurde das so gewonnene Serum steril filtriert.

---

## **2.2.4 Arbeiten mit cDNA/RNA**

### **2.2.4.1 Isolation von RNA**

Die Isolation von RNA aus Monozyten erfolgte nach der Trizol-Methode: Die Monozyten in 300 µl Trizol wurden aufgetaut, mit jeweils 1/5 Volumen Chloroform versetzt (60 µl) und das Gefäß 4-5-mal invertiert. Nach einer Inkubation über 2 min bei RT wurde der Ansatz für 15 min bei 12000 g zentrifugiert. Die so entstandene klare obere Schicht wurde abgezogen, in ein neues Eppendorfcup überführt und wiederum mit 1/5 Volumen Chloroform versetzt. Nach Wiederholung aller bisherigen Schritte wurde zu der klaren Lösung Isopropanol (0,7 Vol.) gegeben, das zum Ausfällen der RNA führt, und mehrmals invertiert. Es folgte eine Inkubation über 10 min auf Eis und eine anschließende Zentrifugation für 30 min bei 12000 g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig mit vorgekühltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt über 15 min bei 12000 g wurde das Ethanol vorsichtig abgenommen und das Pellet getrocknet. Die so gewonnene RNA wurde in 40 µl nukleasefreiem Wasser (Promega) aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

### **2.2.4.2 Real-Time PCR**

Mit Hilfe der Real-Time PCR können Nukleinsäuren schnell und sensitiv quantifiziert werden. Durch die Kombination aus Thermocycler und Fluorimeter kann die Amplifikation von PCR-Produkten schnell analysiert und während des gesamten Reaktionsverlaufs verfolgt werden. Durch die Real-Time PCR konnte die Genexpression in primären Monozyten bestimmt werden. Dazu wurde die RNA der Zellen in einzelsträngige cDNA überführt, welche für die Real-Time PCR eingesetzt werden konnte. Zur Detektion wurde in allen Experimenten auf den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I zurückgegriffen; es wurde der LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche) verwendet. Zuerst wurde ein Master-Mix hergestellt, der bereits alle nötigen Reagenzien enthielt und dem nur noch die cDNA zugesetzt werden musste. Ein Master-Mix für eine Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

---

Reaktionsmix (Roche)	2,0	µl
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	2,4	µl
universe Primer, 5 pmol/µl	1,0	µl
reverse Primer, 5 pmol/µl	1,0	µl
ddH <sub>2</sub> O	11,6	µl

Der Master-Mix wurde nun zu je 18 µl auf dünne Glaskapillaren aufgeteilt. SYBR Green I, Reaktionspuffer, dNTPs und HotStart Taq-Polymerase waren im Reaktionsmix (Roche) bereits enthalten. Nach der Zugabe von 2 µl der jeweiligen cDNA bzw. 2 µl Wasser für die Wasserkontrolle wurden die Kapillaren kurz bei 2000 rpm zentrifugiert, so dass die Reaktion in der Tiefe der Glaskapillaren ablaufen konnte. Anschließend wurden die Proben im LightCycler für 10 min auf 95°C erhitzt. Dabei wurde die Taq-Polymerase aktiviert, die die Amplifizierung der jeweiligen genspezifischen DNA einleitete. Es wurden insgesamt 40 bis 45 Amplifizierungszyklen durchgeführt, wobei sich jeder Zyklus aus 15 s Denaturierungsphase bei 95°C, 10 s Annealingphase bei etwa 60°C (spezifisch für die jeweiligen Primer) und 10 s Elongationsphase bei 72°C zusammensetzte.

Nach Abschluss der Elongationsphase wurde in jedem Amplifikationszyklus die Konzentration an DNA gemessen. Dies geschah durch die Bestimmung der Fluoreszenz bei einer für das PCR-Produkt geeigneten Temperatur (75-85°C). Da sich das SYBR Green I in doppelsträngige DNA einlagert, verhält sich die gemessene Fluoreszenz proportional zum Reaktionsprodukt der amplifizierten DNA (Abbildung 7).

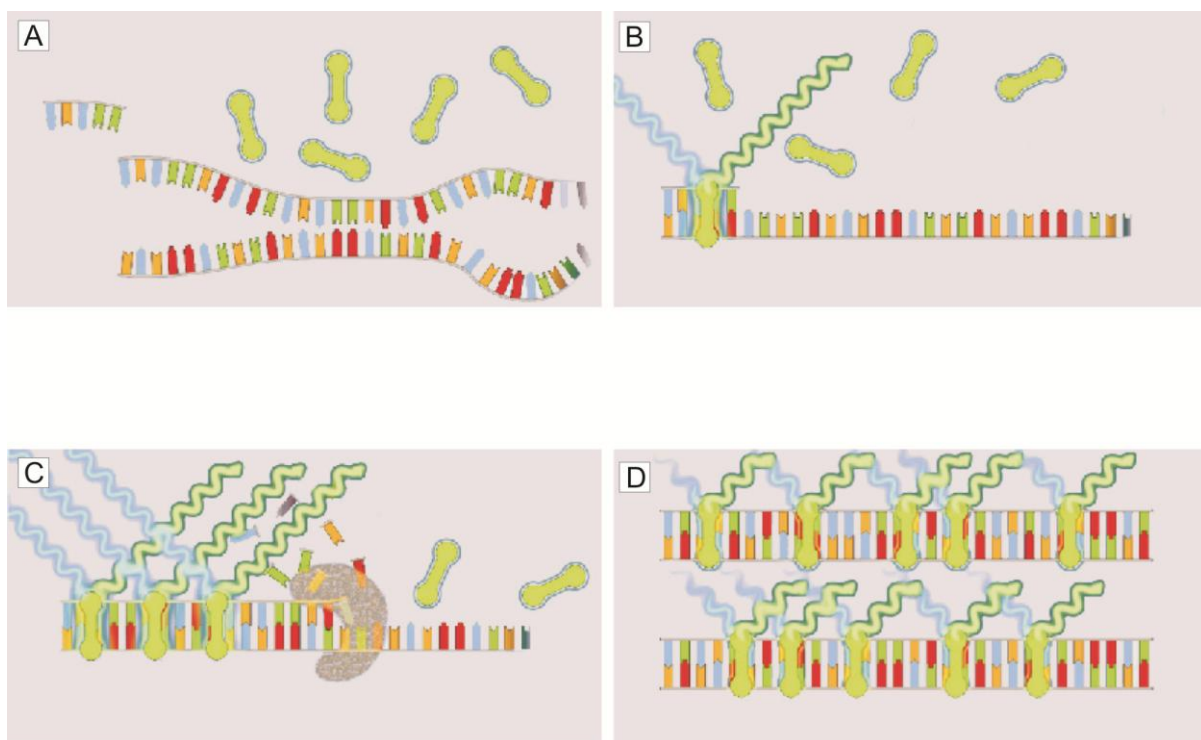
Für jede Probe wurde ein spezifischer Crossing Point (Cp) bestimmt, indem in einem Graphen die Fluoreszenzmesswerte gegen die Zyklenzahl aufgetragen wurden. Der Cp beschreibt den Reaktionszyklus, in dem die gemessene Fluoreszenz einen deutlich positiven Wert annimmt. Außerdem ist der Cp umgekehrt proportional zur Ausgangskonzentration der cDNA. Verschiedene Proben benötigen demnach in Abhängigkeit ihrer Ausgangskonzentration eine unterschiedliche Anzahl an Amplifikationszyklen, um den Cp zu erreichen.

Damit nun verschiedene PCR-Reaktionen unterschiedlicher Effizienz miteinander verglichen werden konnten, bediente man sich einer Standardkurve: Hierzu wurde jeweils eine 1:1-Verdünnungsreihe der betreffenden cDNA hergestellt (Monozyten-cDNA) und jedem der vier Standardproben ein definierter Wert zugewiesen (50, 25, 12,5 und 6,25 ng). Durch die Auftragung der Cp-Werte der Standardproben gegen

den Logarithmus der jeweiligen Konzentration entstand eine Standardkurve, die jedem  $C_p$  eine definierte Konzentration zuordnete.

Um eine Aussage über die Regulation eines bestimmten Zielgens treffen zu können, wurde zusätzlich von jeder Probe die cDNA-Konzentration eines sog. Housekeeping-Gens (hier  $\beta$ -Actin) bestimmt, das durch die jeweilige Stimulation nicht reguliert wurde. Der Quotient aus den cDNA-Konzentrationen des Zielgens und des  $\beta$ -Actins ergibt einen zum Housekeeping-Gen normalisierten Wert, der hinsichtlich Qualitäts- und Quantitätsunterschiede in der Probenvorbereitung korrigiert ist.

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde nach der Amplifikationsphase durch eine Schmelzkurve überprüft: Dazu wurde die cDNA langsam ( $0,1^\circ\text{C/s}$ ) von  $60^\circ\text{C}$  auf  $95^\circ\text{C}$  erhitzt und analog die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Da jede spezifische Reaktion auch nur ein spezifisches Produkt bildet, das bei einer bestimmten Temperatur schmilzt, nimmt am Schmelzpunkt die Fluoreszenz plötzlich stark ab. Entstehen jedoch durch unspezifische Reaktionen mehrere Produkte, so kommt es zu einer unscharfen Abnahme der Fluoreszenz, unter Umständen über mehrere Stufen. Eine schematische Darstellung des PCR-Zyklus bei Verwendung von SYBR Green zeigt Abbildung 7.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus bei Verwendung von SYBR Green I (A) Denaturierung, (B) Annealing, (C) Elongation, (D) PCR-Produkt



---

## **2.2.5 Proteinchemische Methoden**

### **2.2.5.1 Präparation von Gesamtproteinextrakten**

Die Präparation von Gesamtproteinextrakten aus Säugerzellen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Zuerst wurde der Zellüberstand abgenommen. Anschließend folgte ein Waschschriff der am Boden adhärenfen Monozyten mit PBS. Die primären Monozyten wurden daraufhin mit einem Schaber vom Boden der Zellkulturplatten gelöst und mit PBS, das mit einem Proteaseinhibitor versetzt war, gewaschen. Das Zellpellet wurde in 40 µl eiskaltem RIPA-Zelllysepuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und die genomische DNA im Zelllysaf mit Ultraschall geschert. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

### **2.2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode. Dazu wurden die Proben 1:10 in PBS verdünnt. Hiervon wurden wiederum 10 µl mit 200 µl der Reaktionslösung versetzt. Letztere bestand aus einem Gemisch von Bicinchoninsäure und 4%iger Kupfer-II-Sulfatlösung im Verhältnis 1:50. Der Reaktionsansatz wurde anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Proteine bilden dabei über ihr Rückgrat mit Cu<sup>2+</sup>-Ionen einen Komplex, wobei die Cu<sup>2+</sup>-Ionen zu Cu<sup>1+</sup>-Ionen reduziert werden. Diese Cu<sup>1+</sup>-Ionen bilden mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex aus, der photometrisch gemessen werden kann. Die Bildung dieses Farbkomplexes steigt linear mit der vorhandenen Proteinmenge an. Um die Menge an Protein in der Probe quantifizieren zu können, wird jeweils parallel eine Standardkurve mit BSA erzeugt, aus welcher sich die Konzentrationen der unbekannten Proben berechnen lassen.

### **2.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

In der SDS-PAGE werden Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Masse in Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Proteine werden dazu mit SDS-Probenpuffer versetzt und aufgekocht. Dadurch denaturieren die Proteine und interagieren mit SDS, wobei das SDS durch seine aliphatischen Seitenketten die Proteine partiell auffaltet. Der Zusatz von β-Mercaptoethanol zum SDS-Probenpuffer sorgt dafür, dass alle Disulfidbrücken in einem Peptid gespalten werden.

In dieser Arbeit wurden 10%ige und 15%ige Trenngele verwendet. Zum Gießen der Gele wurden 5 ml der Trenngellösung und 2,5 ml der Sammelgellösung (2.1.6.1.2) jeweils mit entsprechenden Mengen an APS und TEMED versetzt, die die radikalische Polymerisierungsreaktion auslösen. In das noch flüssige Sammelgel wurde zur Ausbildung der Taschen ein Kamm mit 10 oder 15 Zähnen gesetzt.

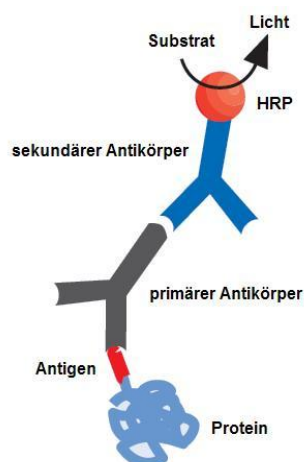
Nach der Polymerisation wurden die Gele in die Elektrophoreseapparatur gespannt und unter 1 x SDS-Gellaufpuffer gesetzt. Anschließend wurden die aufgekochten Proben in die Taschen pipettiert. Zur Größenabschätzung der aufgetrennten Proteine wurde der Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker in die letzte Tasche pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel.

#### **2.2.5.4 Western Blot**

Unter Western Blot versteht man den Transfer von Proteinen, die durch eine SDS-PAGE aufgetrennt wurden, auf eine Membran mit anschließendem immunologischen Nachweis. In dieser Arbeit wurde ein Wetttransfer-Verfahren angewendet, bei dem die Proteine mittels Elektroblood auf die Membran transferiert wurden. Die Proteine werden auf eine Immun-Blot™ PVDF Membran (0,2 µm) (BIORAD) übertragen, die vor Gebrauch kurz in Methanol und danach in Wetttransferpuffer äquilibriert wird. Die jeweils verwendeten Netze, Whatman-Filterpapiere und das Gel wurden ebenfalls mit Wetttransferpuffer äquilibriert. Aus den Filterpapieren, der Membran und dem Gel wird ein „Blot-Sandwich“ aufgebaut und in die Blotapparatur eingespannt. Bei einer Spannung von 80 V findet der Transfer der Proteine auf die Membran statt, währenddessen der Transferpuffer unter Kühlung mit einem Magnetrührer ständig gemischt wird.

Um für die anschließende Detektion der Proteine mittels Antikörper unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran für 1 h in Blockierlösung (2.1.6.1.3) geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in Antikörperlösung. Die Inkubation fand meist über Nacht bei 4°C oder mindestens für 2 h bei RT statt. Die Membran wurde im Anschluss gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist, in 10 ml Blockierlösung. Der sekundäre Antikörper wurde 1:5000 verdünnt, für 1 h inkubiert und die Membran daraufhin wieder gewaschen. Zur Detektion der HRP wurde ECL Plus Western Blotting

Detection Reagent Lösung verwendet. Die beiden Reagenzien der ECL-Lösung wurden laut Herstellerangaben gemischt und 1 ml sofort auf die Membran gegeben. Nach 5 min wurde überschüssiges Reagenz entfernt und die Membran in einer Klarsichtfolie in die lichtdichte Filmkassette gelegt. Die Detektion der Chemilumineszenzsignale erfolgte mit Hyperfilm ECL<sup>TM</sup> abhängig von der Intensität des Signals über einen Zeitraum von 1 min bis zu 60 min. Abbildung 8 zeigt das Prinzip der Proteindetektion auf einer geblotteten Membran mit Hilfe eines ELISAs.



**Abbildung 8:** ELISA in schematischer Darstellung (verändert aus Qiagen-a-HIS-Detection Protokoll)

#### 2.2.5.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit dem Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) können gelöste Proteine spezifisch nachgewiesen werden. Das Prinzip des ELISAs beruht, analog zum Western Blot, auf einer Antikörper-gekoppelten Farbreaktion. Das Protein wird zunächst über einen am Plattenboden gebundenen Antikörper (Capture AK) immobilisiert und anschließend mit einem zweiten Antikörper (Detection AK) detektiert. Der zweite Antikörper wird über eine spezifische Interaktion an ein Enzym gekoppelt, das ein farbloses Chromogen in ein farbiges umsetzt. Der Farbstoff wird proportional zur Menge des gebundenen Proteins gebildet und kann photometrisch erfasst werden. Über eine Standardkurve lässt sich somit die Proteinkonzentration der Proben berechnen. Diese Art des ELISAs wird als „Sandwich-ELISA“ bezeichnet. Eine schematische Darstellung dieses Vorgangs zeigt Abbildung 9.

Auf die in dieser Arbeit verwendeten ELISAs wird im Folgenden näher eingegangen.

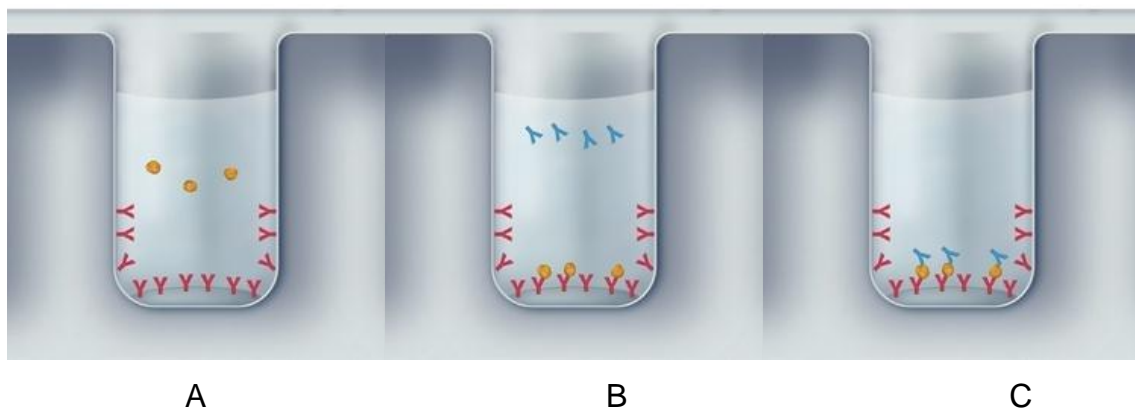
#### **2.2.5.5.1 Human Galectin-3 BMS279/2CE**

Die bereits mit Capture AK gecoateten Mikrotiterplatten wurden zuerst zweimal mit 300 µl Waschpuffer pro Well gewaschen, bevor der Standard gemäß den Herstellerangaben in Sample Diluent verdünnt aufgetragen wurde. Die Verdünnung der Proben erfolgte ebenfalls in Sample Diluent, der auch als Blank diente. Die Monozytenüberstände wurden dabei auf 1:4 verdünnt. Gegebenenfalls wurde anstelle der Überstände Serum verwendet. Nach Auftragen des Standards und der Proben wurden 50 µl des vorverdünnten Biotin-Konjugats pro Loch hinzugegeben und bei RT auf einem Rotor mit 200 rpm für 2 h inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der Mikrotiterplatte verworfen und die Platte dreimal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen, bevor je 100 µl der verdünnten Streptavidin-HRP hinzupipettiert wurden. Es schloss sich ein weiterer Inkubationsschritt bei RT mit 200 rpm für 1 h an. Danach wurde der Inhalt der Mikrotiterplatte wie bereits zuvor verworfen und die Platte dreimal mit 300 µl gewaschen. Nun wurde 100 µl HRP-Substratlösung in alle Vertiefungen zugegeben und die Platte für 10 min bei RT inkubiert, wobei es vermieden wurde, die Proben direktem Licht auszusetzen. Abschließend wurde die Farbreaktion durch die Zugabe von 100 µl Stopplösung inhibiert und die Proteinkonzentration mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm vermessen. Dabei wurden die Werte durch Subtraktion der jeweiligen Intensitäten bei 650 nm, dem unspezifischen Hintergrundsignal, korrigiert.

#### **2.2.5.5.2 DuoSet® ELISA Development System human Adiponectin**

Der Capture AK wurde laut Protokoll in PBS verdünnt, auf einer 96-Loch-Platte zu je 100 µl pro Well verteilt und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte mit jeweils 300 µl Waschpuffer dreimal gewaschen, bevor sie mit Reagent Diluent für eine Stunde blockiert wurde. Anschließend wurde die Platte erneut dreimal gewaschen. Nun konnten sowohl der Standard als auch die Proben pipettiert werden. Der Standard wurde laut Hersteller in Reagent Diluent verdünnt. Die Proben wurden je nach der zu erwartenden Menge des zu bestimmenden Proteins ebenfalls in Reagent Diluent, der auch als Leerwert diente, verdünnt. Es folgte eine weitere Inkubation mit den Proben für 2 h bei RT. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Platte 2 h mit dem biotinylierten Detection AK inkubiert und wiederum dreimal gewaschen. Es folgte eine 20-minütige Inkubation mit HRP-Streptavidin, das über

das Streptavidin spezifisch an das Biotin des sekundären Antikörpers bindet. Nach einem letzten Waschschriff wurde die Platte mit einer Substratlösung aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin inkubiert, in der die HRP die Bildung eines blauen Farbstoffs unterstützt. Nach 20 min wurde die Reaktion durch die Zugabe einer Stopplösung beendet, wodurch die Farbe von blau nach gelb umschlug. Die Intensität dieser Gelbfärbung wurde im Anschluss mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des Prinzips eines Sandwich-ELISAs (verändert nach [www.rndsystems.com/DAM\\_public/5633.jpg](http://www.rndsystems.com/DAM_public/5633.jpg)):

- A: Das zu messende Protein bindet an den Capture AK und wird dadurch immobilisiert
- B: Ein mit einem Enzym gekoppelter Detection AK bindet am Protein-AK-Komplex
- C: Durch Zugabe eines Substrates kommt es zur Farbreaktion durch das am Detection AK gekoppelte Enzym

### 2.2.6 Stimulation von primären Monozyten

Zur Stimulierung der Zellen wurden jeweils drei Millionen Zellen pro Loch auf einer 6-Loch-Platte ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in 1 ml RPMI 1640 Medium und wurde mit 10% autologem Serum versetzt.

Die primären Monozyten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert; am nächsten Morgen erfolgte ein Mediumwechsel und die Stimulation mit 10 µg Adiponectin der Firma R&D Systems bzw. mit 2 µg des in der Arbeitsgruppe hergestellten rekombinanten, trimeren Adiponectin. Alternativ wurden die Zellen mit Metformin, Palmitin- oder Ölsäure stimuliert. Die freien Fettsäuren wurden dabei mit Albumin eines fettsäurefreien Kälberserums im Verhältnis 1:1 komplexiert. Gegebenenfalls wurden die Monozyten eine Stunde vor Stimulation mit dem AMPK-Inhibitor Compound C bzw. dem p38 MAPK-Inhibitor SB 203580 vorinkubiert.

---

Nicht-stimulierte Zellen dienten jeweils als Kontrollen. Im Weiteren wurden die Zellen erneut im Brutschrank 24 Stunden inkubiert. Zum Abnehmen der Zellen wurden zunächst die Überstände kurz abzentrifugiert (2000 rpm, 5 min) und bei -20°C aufbewahrt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend in PBS vom Plattenboden abgeschabt. Schließlich wurden auch diese bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Zellen, die zur Herstellung von Proteinextrakt bestimmt waren, wurden in einer entsprechenden Menge RIPA-Puffer (ca. 40 µl) aufgenommen. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

### **2.2.7 Statistik**

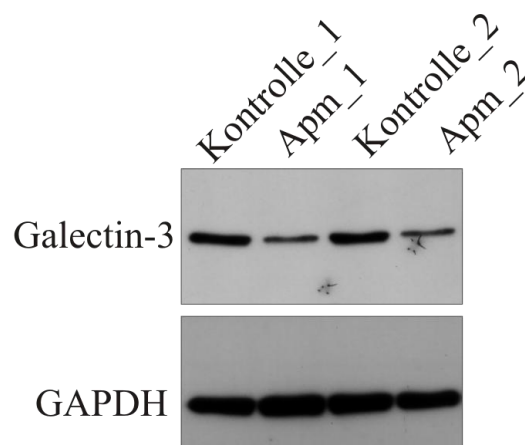
Für nicht-normalverteilte Daten wurden der Median, der niedrigste und der höchste Wert angegeben. Der Mann Whitney U-Test oder der Students T-Test wurden für die Berechnung von statistischen Unterschieden benutzt und ein p-Wert von  $< 0.05$  wurde als signifikant bewertet. Korrelationen wurden mit Hilfe der Pearson Korrelation berechnet. Als Software diente SPSS 15.0.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von Adiponectin auf das monozytäre Galectin-3

##### 3.1.1 Reduktion des zellulären Galectin-3 durch Adiponectin

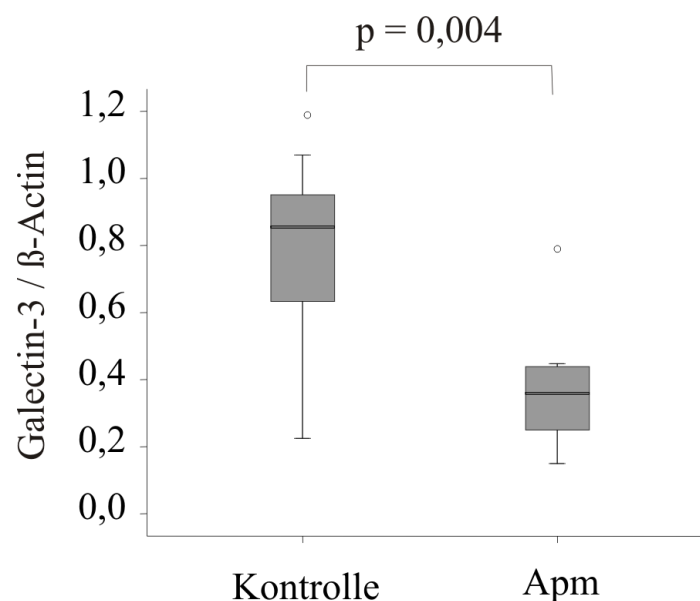
Um den Einfluss von Adiponectin auf die zelluläre Galectin-3-Expression zu klären, wurden Monozyten aus dem Vollblut fünf normalgewichtiger Spender isoliert. Die Zellen wurden in Medium mit 10% autologem Serum für 12 h inkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Monozyten entweder mit 10 µg/ml Adiponectin für 24 h stimuliert oder ohne weitere Zusätze kultiviert. Mittels Western Blot wurden die Zelllysate nach Extraktion des Gesamtproteins auf die Menge an Galectin-3-Protein hin untersucht. Als Ladungskontrolle wurde dabei Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) verwendet. Es konnte eine Reduktion von Galectin-3 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle in denjenigen Monozyten beobachtet werden, die mit Adiponectin behandelt worden waren. Anschließend wurden die Western Blot Ergebnisse der fünf voneinander unabhängigen Experimente mit Optiquant quantifiziert. Es ergab sich eine Abnahme von Galectin-3 von 8,6 (7,2-9,1) in den Monozyten der Kontrollen auf 6,0 (4,2-6,1) in den mit Adiponectin versetzten Zellen ( $p=0,001$ ). In Abbildung 11 sind zwei repräsentative Versuche dargestellt.



**Abbildung 11:** Western Blot gegen Galectin-3 und GAPDH mit Zelllysaten primärer Monozyten von zwei Spendern mit und ohne (Kontrolle) Inkubation mit 10 µg/ml Adiponectin (Apm) über 24 h

### 3.1.2 Verminderung der Galectin-3-mRNA-Expression durch Adiponectin

Von acht verschiedenen Spendern wurden Monozyten isoliert, um eine mögliche Veränderung von Galectin-3 auf RNA-Ebene unter dem Einfluss von Adiponectin zu beleuchten. Dazu wurde aus den mit Adiponectin stimulierten Zellen und den jeweiligen Kontrollen nach der Trizol-Methode RNA gewonnen und in cDNA überführt. Die mittels Real Time RT-PCR gemessenen Werte für Galectin-3 wurden mit  $\beta$ -Actin als Housekeeper normalisiert. Es zeigte sich, dass die Galectin-3-mRNA-Expression in den mit Adiponectin inkubierten Monozyten ungefähr um die Hälfte geringer ausfiel als in den Kontrollen ( $p=0,004$ , Abbildung 12).



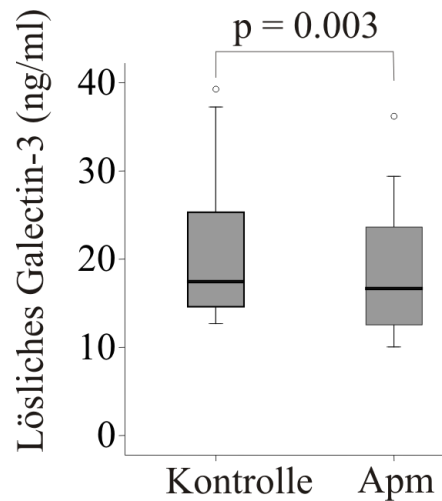
**Abbildung 12:** Real Time RT-PCR Analyse der Galectin-3-mRNA-Expression in primären Monozyten stimuliert mit PBS (Kontrolle) oder 10  $\mu$ g/ml Adiponectin (Apm) über 24 h

### 3.1.3 Abnahme des extrazellulären Galectin-3 durch Adiponectin

Neben seiner Lokalisation im Nukleus und Zytoplasma kann Galectin-3 nach Ausschleusung auch im Extrazellularraum ausgemacht werden. Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob Adiponectin die Menge an extrazellulärem Galectin-3 verändert. Hierfür wurden primäre Monozyten von dreizehn unterschiedlichen Spendern gewonnen. Im Vergleich zu den Kontrollen konnte in den Überständen der Monozyten, die 24 h mit Adiponectin stimuliert worden waren,



mittels ELISA eine Reduktion der löslichen Galectin-3-Menge von ungefähr 15% nachgewiesen werden, wie Abbildung 13 zeigt.



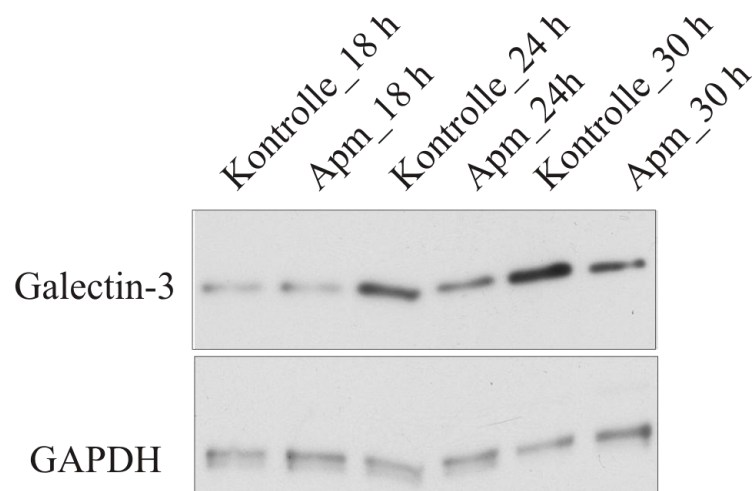
**Abbildung 13:** Extrazelluläres Galectin-3 in den Überständen primärer Monozyten inkubiert mit PBS (Kontrolle) oder 10 µg/ml Apm für 24 h

Da Galectin-3 auch im Serum vorhanden ist, wurde anhand zehn normalgewichtiger, männlicher Spender analysiert, welchen Anteil die Menge an Galectin-3-Protein, welches den Zellen in Form des mit 10% autologem Serum versetzten Mediums zugeführt wird, an der Galectin-3-Gesamtmenge in den Überständen einnimmt. Im Serum der Proben wurden mittels ELISA Galectin-3-Konzentrationen von 3,4 (2,9-3,6) ng/ml gemessen, wohingegen in den Überständen Konzentrationen von 17,6 (7,5-43,7) ng/ml festgestellt wurden. Daraus wurde ersichtlich, dass weniger als 5% des in den Überständen gemessenen Galectin-3 auf das Serum zurückzuführen sind (Daten nicht gezeigt).

#### 3.1.4 Wirkung von Adiponectin auf Galectin-3 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Um zu beurteilen, welche Auswirkung die Inkubationszeit bei der Adiponectin-abhängigen Regulation von Galectin-3 in Monozyten spielt, wurden Zellen von drei verschiedenen Spendern gesammelt und diese für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Die Kontrollen wurden jeweils mit PBS behandelt, wohingegen die übrigen Zellen mit 10 µg/ml Adiponectin versetzt wurden. Die Inkubationszeit variierte zwischen 18 h,

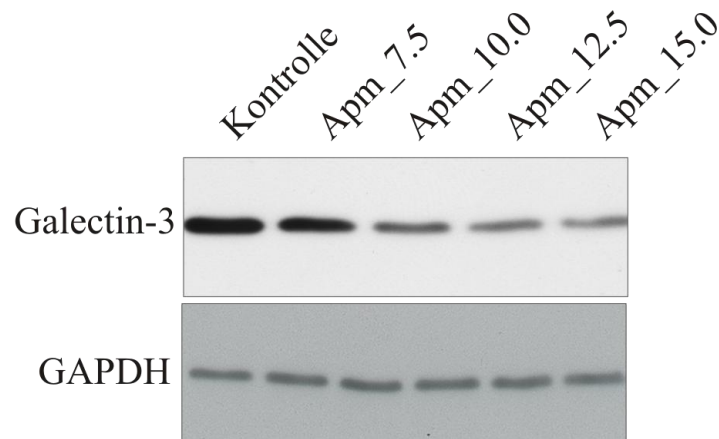
24 h und 30 h. Während die Galectin-3-Konzentration in den Monozyten, die zur Kontrolle dienten, über den zeitlichen Verlauf hinweg anstieg, konnte in den mit Adiponectin behandelten Zellen beobachtet werden, dass Galectin-3 nach 24 h signifikant herabreguliert wurde. Eine ähnliche Abnahme des Galectin-3-Proteins zeichnete sich in Monozyten ab, die für 30 h mit Adiponectin inkubiert worden waren (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Western Blot gegen Galectin-3 und GAPDH mit Zelllysaten primärer Monozyten stimuliert mit PBS (Kontrollen) oder 10 µg/ml Adiponectin (Apm) für 18 h, 24 h oder 30 h

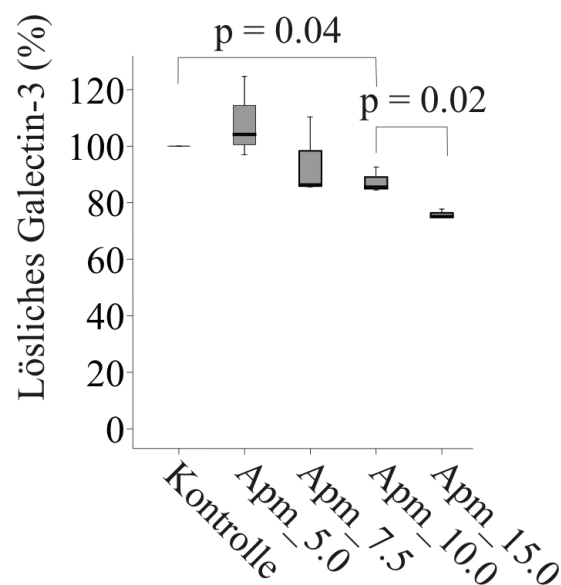
### 3.1.5 Dosisabhängiger Effekt von Adiponectin auf die Galectin-3-Proteinmenge

Im Anschluss daran wurde untersucht, welchen Effekt steigende Konzentrationen von Adiponectin auf die Galectin-3-Menge ausüben, indem primäre Monozyten dreier unterschiedlicher Spender isoliert und für 24 h mit variierenden Adiponectinkonzentrationen stimuliert wurden. Mit Hilfe von Western Blots der Zelllysate zeigte sich bei Konzentrationen von 10,0, 12,5 und 15,0 µg/ml Adiponectin eine vergleichbare Reduktion des zellulären Galectin-3. Adiponectin in einer Dosierung von 7,5 µg/ml führte nur zu einer vergleichsweise geringen Abnahme an Galectin-3, wohingegen 5 µg/ml Adiponectin Galectin-3 nicht beeinflusste. Die Daten zeigt zum Teil Abbildung 15.



**Abbildung 15:** Western Blot gegen Galectin-3 und GAPDH mit Zelllysaten primärer Monozyten kultiviert mit PBS (Kontrollen) oder 7,5, 10,0, 12,5 und 15,0 µg/ml Adiponectin (Apm) für 24 h

In ähnlicher Weise wurde in einem Versuch die dosisabhängige Wirkung von Adiponectin auf das im Extrazellularraum befindliche Galectin-3 untersucht. Eine Analyse der Überstände mittels ELISA ließ erkennen, dass sich das lösliche Galectin-3 bei einer Adiponectinmenge von 10 µg/ml verringerte. Eine Adiponectindosierung von 7,5 µg/ml reduzierte Galectin-3 tendenziell, während 5,0 µg/ml keine Veränderung erkennen ließ. Eine zusätzliche Reduktion konnte in den Überständen der Monozyten beobachtet werden, die mit 15,0 µg/ml rekombinantem Adiponectin inkubiert worden waren. Abbildung 16 verdeutlicht die Ergebnisse.

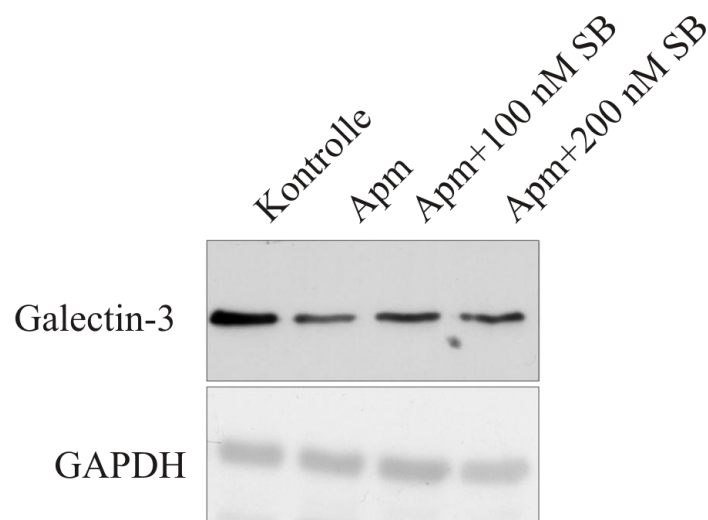


**Abbildung 16:** Lösliches Galectin-3 in Überständen primärer Monozyten inkubiert mit PBS (Kontrollen) oder 5,0, 7,5, 10,0 und 15,0 µg/ml Apm für 24 h

### 3.2 Wirkungsmechanismus der Adiponectin-vermittelten Suppression von Galectin-3

#### 3.2.1 Beteiligung des p38 MAP-Kinase-Weges an der Regulation von Galectin-3 durch Adiponectin

Adiponectin aktiviert die p38 MAP-Kinase. Dieses Enzym wiederum katalysiert die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und steuert damit die Transkription zahlreicher Gene. Im folgenden Experiment wurde daher näher analysiert, inwieweit diese Kinase an der Suppression von Galectin-3 durch Adiponectin beteiligt ist. Hierzu wurde SB 203580, ein spezifischer Inhibitor der p38 MAP-Kinase, eingesetzt. Dieser diente dazu, eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase zu verhindern und damit einen definierten Teil der Signaltransduktionskaskade, die durch Adiponectin ausgelöst wird, zu blockieren. Monozyten zweier Spender wurden isoliert und entweder nur mit Adiponectin für 24 h inkubiert oder mit 100 nM beziehungsweise 200 nM SB 203580 1 h vorinkubiert und dann für 24 h mit Adiponectin kultiviert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Western Blots der Zelllysate gegen Galectin-3 ergaben, wie bereits oben beschrieben, eine Abnahme von Galectin-3 durch Adiponectin. Die Zellen, die zusätzlich mit SB 203580 behandelt worden waren, wiesen geringfügig höhere Galectin-3-Werte auf als diejenigen, die ausschließlich mit Adiponectin stimuliert waren (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Western Blot gegen Galectin-3 und GAPDH mit Zelllysaten primärer Monozyten inkubiert mit 10 µg/ml Apm oder in Kombination mit dem p38 MAP-Kinase Inhibitor SB 203580 (100 nM oder 200 nM) für 24 h

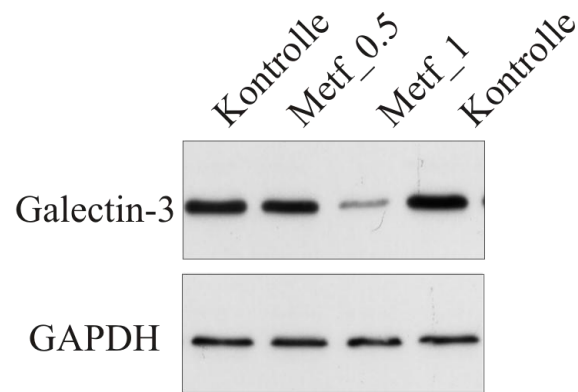
### **3.2.2 Aktivierung der AMPK durch Adiponectin**

Neben dem p38 MAP-Kinase-Weg beruht ein wesentlicher Anteil der Wirkung von Adiponectin auf der Aktivierung der Adenosine 5' Monophosphate – Activated Protein Kinase (AMPK). Dieses Enzym spielt eine zentrale Rolle bei der Steuerung des Metabolismus, indem es den aktuellen Energiestatus der Zelle misst und auf diesen adäquat reagiert. Bei einer Mangelversorgung kommt es durch Hydrolyse zu einem Abfall der zellulären Energiewährung ATP und einem Anstieg von AMP, das die AMPK stimuliert. Die aktivierte AMPK reguliert Enzyme von Stoffwechselprozessen mit hohem Energieaufwand herab und wirkt so dem ATP-Mangel entgegen. Zusätzlich zu seiner zentralen Aufgabe im Metabolismus unterdrückt die AMPK auch entzündliche Vorgänge im Körper und moduliert Zytokin-abhängige Signalwege in Makrophagen in Richtung der Entwicklung eines antiinflammatorischen Phänotyps.

#### **3.2.2.1 Reduktion der Galectin-3-Expression durch Metformin und AICAR**

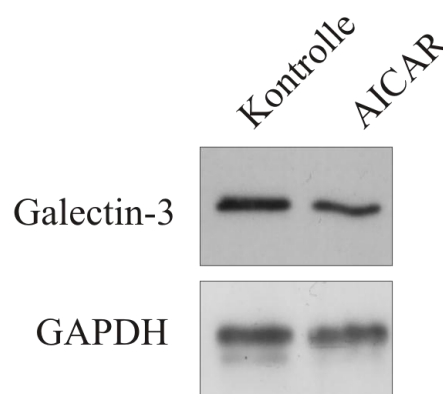
Neben Adiponectin kann die AMPK durch Metformin und AICAR aktiviert werden. Metformin ist als orales Antidiabetikum weit verbreitet und gilt vor allem bei übergewichtigen Typ 2 Diabetikern nach erfolgloser diätetischer Behandlung als Mittel erster Wahl. Seine Wirkung entfaltet dieses Medikament, das zur Gruppe der Biguanide gehört, vornehmlich über eine Verminderung der Insulinresistenz und verbessert so die diabetogene Stoffwechselsituation.

Um zu klären, welchen Effekt Metformin auf die monozytäre Galectin-3-Konzentration ausübt, wurden primäre Monozyten mit ansteigenden Konzentrationen von 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM Metformin für 24 h kultiviert. Ab einer Konzentration von 1 mM konnte mittels Western Blot der Zelllysate eine Reduktion der Galectin-3-Menge beobachtet werden, wohingegen die Stimulation mit geringeren Metforminkonzentrationen keine sichtbare Veränderung erkennen ließ (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Western Blot gegen Galectin-3 und GAPDH mit Zelllysaten primärer Monozyten inkubiert mit H<sub>2</sub>O (Kontrollen) oder 0,5 und 1 mM Metformin (Metf) über 24 h

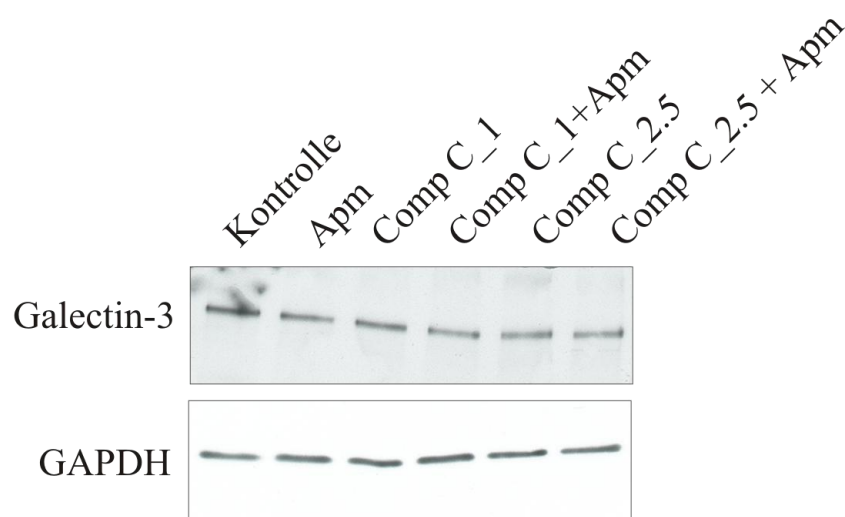
Wie Adiponectin und Metformin ist 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-1-4-Ribofuranosid (AICAR) in der Lage, den Stoffwechselregulator AMPK zu aktivieren. Im folgenden Experiment wurde daher untersucht, ob auch AICAR die zelluläre Galectin-3-Konzentration beeinflusst. Die isolierten primären Monozyten zwei voneinander unabhängiger Spender wurden mit 0,5 mM AICAR versetzt und für 24 h inkubiert. Im Gegensatz zu den Kontrollen fielen die Galectin-3-Werte der mit AICAR behandelten Zellen in den Western Blots der Zelllysate niedriger aus (Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Western Blot Analyse der Expression von Galectin-3 in Zelllysaten primärer Monozyten stimuliert mit 0,5 mM 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-1-4-Ribofuranosid (AICAR) für 24 h

### 3.2.2.2 Wirkung des AMPK-Inhibitors Compound C auf die monozytäre Galectin-3-Reduktion durch Adiponectin

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die zelluläre Galectin-3-Menge in Monozyten zusätzlich zu Adiponectin auch durch weitere AMPK-Agonisten wie dem Biguanid Metformin sowie AICAR verändert werden kann, sollte nun in einem weiteren Schritt geklärt werden, inwieweit Compound C (Comp C) als potenter AMPK-Inhibitor einen Effekt auf die Galectin-3-Repression durch Adiponectin ausüben kann. Um dies aufzudecken, wurden primäre Monozyten für 24 h einerseits als Referenzgruppen mit 10 µg Adiponectin, 1 oder 2,5 µM Compound C versetzt und andererseits mit Adiponectin und Compound C gleichzeitig inkubiert. Daraus resultierte, dass Zellen sowohl mit einer Compound C-Dosierung von 1 als auch von 2,5 µM identische Galectin-3-Konzentrationen aufwiesen wie Zellen, die darüber hinaus mit Adiponectin stimuliert worden waren. Die Wirkung von Adiponectin auf das monozytäre Galectin-3 konnte durch den AMPK-Inhibitor vollständig aufgehoben werden. Jedoch ist anzuführen, dass Compound C allein zu einer diskreten Reduktion von Galectin-3 führte, wenn die Ergebnisse mit der unbehandelten Kontrolle verglichen wurden (Abbildung 20).



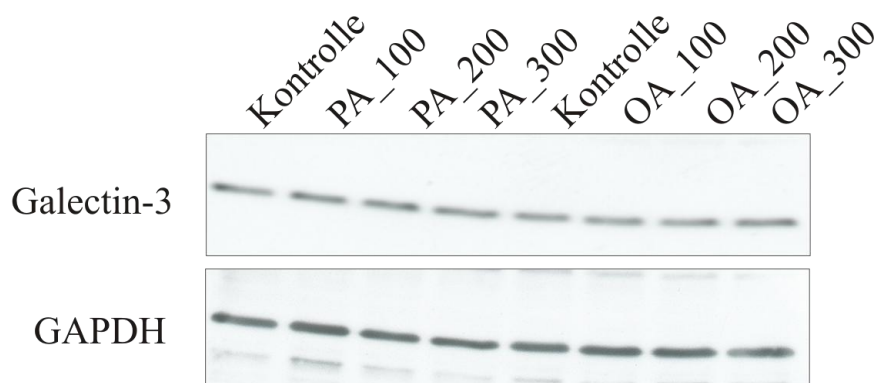
**Abbildung 20:** Western Blot gegen Galectin-3 und GAPDH mit Zelllysaten primärer Monozyten inkubiert mit 10 µg Adiponectin (Apm), 1 oder 2,5 µM Compound C (Comp C) allein oder in Kombination mit 10 µg Adiponectin für 24 h

### 3.3 Lipide und ihr Effekt auf die monozytäre Galectin-3-Konzentration

Dyslipidämie ist ein Kennzeichen des metabolischen Syndroms. Jedoch finden sich im Serum von Menschen mit Adipositas nicht nur erhöhte Werte von Triglyzeriden, sondern auch vermehrt freie Fettsäuren. Diese wiederum sind ein Risikofaktor für das frühzeitige Auftreten von atherosklerotischen Gefäßveränderungen und den damit assoziierten Krankheitsbildern wie koronarer Herzkrankheit (KHK). Außerdem wird die Wirkung von Insulin durch die Konzentration der freien Fettsäuren mitreguliert. So verschlechtern erhöhte Spiegel an freien Fettsäuren die periphere Glukoseaufnahme und induzieren damit eine Resistenz der Zellen gegenüber Insulin, wodurch das Auftreten einer diabetogenen Stoffwechsellage unterstützt wird.

#### 3.3.1 Fehlende Beeinflussung des endogenen Galectin-3 durch freie Fettsäuren

Im folgenden Experiment war von Interesse, ob auch eine Veränderung der zellulären Galectin-3-Konzentrationen durch die Stimulation mit freien Fettsäuren bewirkt werden kann. Hierzu wurden primäre Monozyten mit ansteigenden Konzentrationen von 100, 200 und 300  $\mu\text{M}$  Palmitin- oder Ölsäure für 24 h inkubiert und anschließend Galectin-3 mittels Western Blot untersucht. Keine der beiden Fettsäuren führte zu einer Regulation der zellulären Galectin-3-Spiegel. (Abbildung 21)

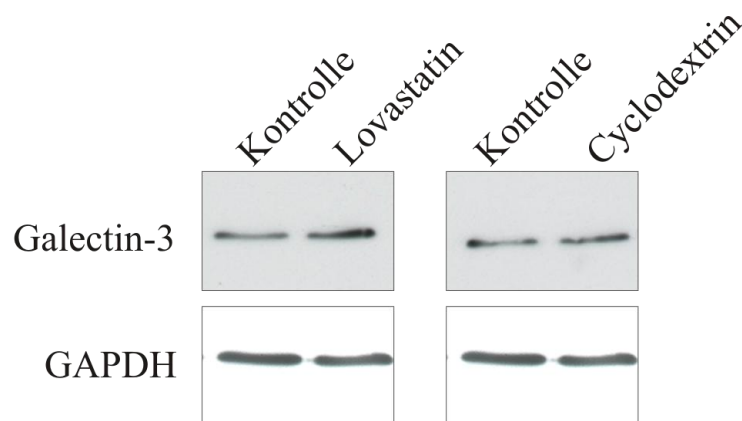


**Abbildung 21:** Western Blot gegen Galectin-3 und GAPDH mit Zelllysaten primärer Monozyten stimuliert mit jeweils 100, 200 oder 300  $\mu\text{M}$  Palmitin- (PA) oder Ölsäure (OA) für 24 h



### 3.3.2 Auswirkung des zellulären Cholesterin-Spiegels auf Galectin-3

Die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) ist ein Schlüsselenzym der Cholesterinsynthese und wird über negative Rückkopplung gehemmt. Pharmazeutisch kann dieses Enzym durch die Gruppe der Statine inhibiert werden, wodurch therapeutisch zu hohe Cholesterinwerte, wie sie unter anderem beim metabolischen Syndrom zu finden sind, supprimiert werden können. Eine Akkumulation von Cholesterin ist charakteristisch für Schaumzellen, welche in die Gefäß-Intima eingewanderte Makrophagen darstellen und zur atherosklerotischen Plaquebildung beitragen. Im Folgenden wurden Monozyten mit dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Lovastatin in einer Dosierung von 5  $\mu$ M für 24 Stunden inkubiert. Des Weiteren wurden Zellen mit 1 mg/ml Cyclodextrin für 12 Stunden behandelt. Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide, welche aus  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verknüpften Glukosemolekülen bestehen. Es entsteht eine toroidale Struktur mit einem zentralen Hohlraum. Durch die hydrophobe Kavität im Inneren, die von einer polaren hydrophilen Außenfläche umgeben ist, besitzen Cyclodextrine die Eigenschaft, Einschlussverbindungen mit apolaren Verbindungen bei guter Wasserlöslichkeit zu formen. An der Plasmamembran führt dies zu einer selektiven Entfernung von Cholesterin. Die Analyse von Galectin-3 mittels Western Blot der Zelllysate ließ weder eine Veränderung durch die Behandlung mit Lovastatin noch durch Cyclodextrin erkennen, wie Abbildung 22 zeigt.



**Abbildung 22:** Western Blot gegen Galectin-3 und GAPDH mit Zelllysaten primärer Monozyten behandelt mit 5  $\mu$ M Lovastatin für 24 h oder 1 mg/ml Cyclodextrin für 12 h

---

### **3.4 Monozytäre Galectin-3-Spiegel in den drei Kollektiven NW, OW und T2D**

Wie in den vorangegangenen Experimenten belegt werden konnte, führt eine Stimulation von Monozyten mit Adiponectin in vitro zu einer Herabregulation sowohl von zellulärem als auch löslichem Galectin-3. Adiponectin wiederum korreliert negativ mit dem BMI, was bedeutet, dass bei Adipositas geringere Adiponectinwerte im Serum gemessen werden konnten als bei Normalgewichtigen. Im Folgenden war daher von Interesse, inwieweit sich die in vitro dargestellten Effekte in vivo widerspiegeln. Zu diesem Zweck wurden drei Kollektive erstellt, welche sich aus normalgewichtigen, männlichen Kontrollen (NW) mit einem BMI von weniger als 25 kg/m<sup>2</sup>, übergewichtigen, männlichen Kontrollen (OW) mit einem BMI von mehr als 25 kg/m<sup>2</sup> und männlichen Typ 2 Diabetikern (T2D) zusammensetzten.

#### **3.4.1 Vergleich der basalen zellulären Galectin-3-Expression in den Monozyten der drei Gruppen NW, OW und T2D**

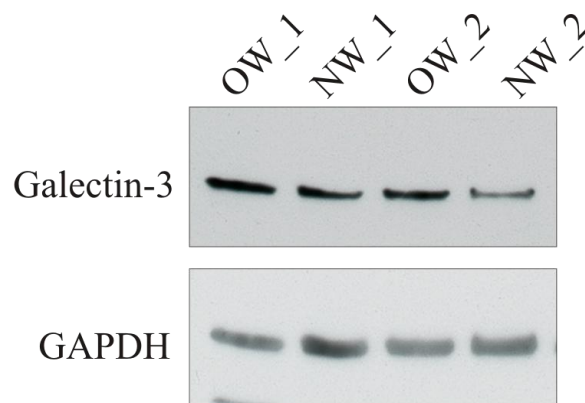
Aus dem Vollblut 10 normalgewichtiger und 10 übergewichtiger Kontrollen sowie 7 Spendern mit Typ 2 Diabetes wurden Monozyten isoliert, um die basalen Galectin-3-Werte in den drei Kollektiven untereinander vergleichen zu können. Einzelheiten der drei Gruppen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Mit den daraus gewonnenen Zelllysaten wurden Western Blots durchgeführt und die zelluläre Galectin-3-Menge bestimmt. Dabei ergab sich, dass die Galectin-3-Expression bei den übergewichtigen Spendern im Vergleich zu normalgewichtigen Probanden signifikant ansteigt. Ebenso wiesen Typ 2 Diabetiker signifikant höhere Galectin-3-Konzentrationen auf als übergewichtige Kontrollen. Abbildungen 23 und 24 veranschaulichen in einem repräsentativen Auszug die angeführten Ergebnisse.

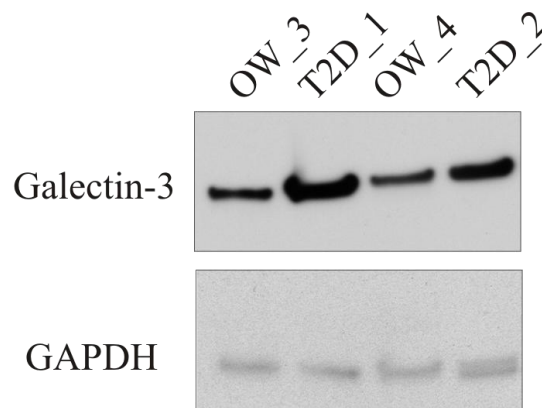
**Tabelle 1:** Anthropometrische und biochemische Merkmale der männlichen Spender, die für die Isolation von Monozyten verwendet wurden

	<b>T2D</b>	<b>OW</b>	<b>NW</b>	<b>p-Wert</b>
Probanden (n)	n = 7	n = 10	n = 10	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28,2 (27,0-56,2)	29,7 (26,7-33,3)	23,9 (20,1-24,9)	<0,001 <sup>#,§</sup>
WHR	1,00 (1,00-1,08)	1,01 (0,94-1,09)	0,96 (0,84-1,05)	0,03 <sup>§</sup>
Apm (µg/ml)	1,2 (0,7-2,5)	3,6 (1,2-9,4)	4,0 (1,4-6,7)	0,003*, <0,001 <sup>§</sup>
Zelluläres Galectin-3 (arbitrary units)	13,0 (6,3-24,0)	6,3 (4,3-9,6)	4,2 (1,4-7,9)	0,007*, 0,029 <sup>#</sup> , <0,001 <sup>§</sup>

Body Mass Index (BMI), Normalgewichtige Kontrollen (NW), Übergewichtige Kontrollen (OW), Typ 2 Diabetiker (T2D), Waist to Hip Ratio (WHR),  
Signifikanz von T2D gegenüber OW = \*, von OW gegenüber NW = #, von T2D gegenüber NW = §

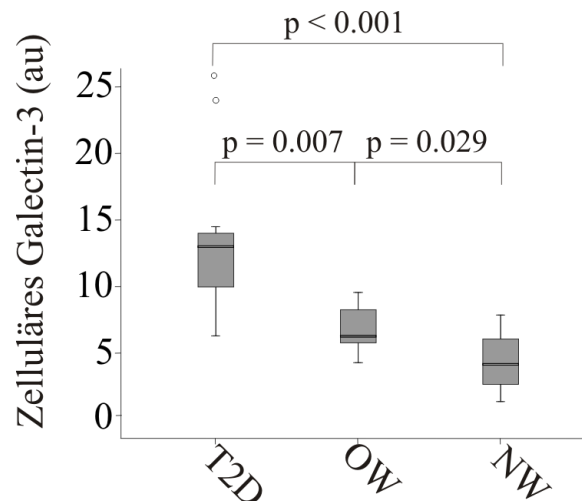


**Abbildung 23:** Western Blot gegen Galectin-3 und GAPDH mit Zelllysaten primärer Monozyten isoliert aus dem Blut von übergewichtigen (OW\_1, OW\_2) und normalgewichtigen Kontrollen (NW\_1, NW\_2)



**Abbildung 24:** Western Blot gegen Galectin-3 und GAPDH mit Zelllysaten primärer Monozyten isoliert aus dem Blut von übergewichtigen (OW\_3, OW\_4) und Typ 2 Diabetikern (T2D\_1, T2D\_2)

Anschließend wurden die Western Blot Resultate quantifiziert und graphisch dargestellt. Wie Abbildung 25 zu entnehmen ist, sind die Galectin-3-Konzentrationen am höchsten in der Gruppe der Patienten mit Typ 2 Diabetes. Im Vergleich dazu fallen die Galectin-3-Spiegel bei den übergewichtigen Kontrollen deutlich ab, wohingegen die geringsten Galectin-3-Werte bei den Spendern mit normalem Körpergewicht gemessen wurden.



**Abbildung 25:** Quantifizierung der Western Blots von den Zelllysaten der in Tabelle 1 aufgeführten Spender eingeteilt in Typ 2 Diabetiker (T2D), übergewichtige Kontrollen (OW) und normalgewichtige Kontrollen (NW), Angaben in arbitrary units (au)

### 3.4.2 Bestimmung der basalen Konzentration von löslichem Galectin-3 in den Monozyten der drei Kollektive

Neben dem zellulären Anteil, der, wie bereits demonstriert, bei Patienten mit Typ 2 Diabetes ansteigt, wird Galectin-3 auch in den Extrazellularraum freigesetzt. Im folgenden Experiment wurde analysiert, in welchem Umfang auch eine Veränderung des löslichen Galectin-3 innerhalb der drei oben genannten Gruppen beobachtet werden kann. Hierzu wurden aus dem Vollblut 20 normalgewichtiger und 20 übergewichtiger Kontrollen sowie 23 Typ 2 Diabetikern Monozyten isoliert. Detaillierte Angaben sind in Tabelle 2 aufgeführt. Dieses Kollektiv enthält auch die in Tabelle 1 aufgelisteten Spender.

**Tabelle 2:** Anthropometrische und biochemische Charakteristika der Probanden der 3 Kollektive, bei denen Galectin-3 in den Überständen gemessen wurde (alle männlich)

	<b>T2D</b>	<b>OW</b>	<b>NW</b>	<b>p-Wert</b>
Probanden (n)	n = 23	n = 20	n = 20	
Alter (Jahre)	60 (42-81)	56 (40-75)	62 (49-73)	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30,0 (23,0-56,2)	29,8 (26,7-36,5)	23,4 (20,0-24,9)	<0,001 <sup>#,§</sup>
WHR	1,05 (0,80-1,11)	1,01 ( 0,9-1,13)	0,97 (0,83-1,06)	0,002 <sup>#</sup> , <0,001 <sup>§</sup>
Glukose (mg/dl)	143 (88-170)	87 (74-110)	85 (70 -115)	<0,001 <sup>*,§</sup>
HDL (mg/dl)	47 (33-60)	59 (34-78)	56 (42-80)	<0,001 <sup>*,§</sup>
LDL (mg/dl)	91 (67-160)	117 (64-212)	100 (54-234)	0,002 <sup>*</sup>
Lösliches	11,4 (5,0-38,4)	14,7 (7,3-40,0)	21,3 (7,5-46,4)	0,043 <sup>*</sup> ,
Galectin-3				0,003 <sup>§</sup>
(ng/ml)				

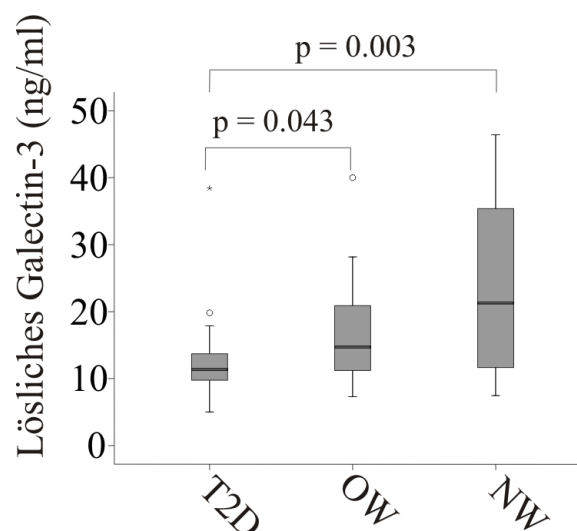
**Medikation:**

ACE-Hemmer	3	2	
Betablocker	5	2	1
Diuretika	7	2	0
Lipidsenker	4	3	1
Metformin	19	0	0
Insulin	3	0	0

Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors (ACE-Hemmer), Body Mass Index (BMI), High Density Lipoprotein (HDL), Low Density Lipoprotein (LDL), Normalgewichtige Kontrollen (NW), Übergewichtige Kontrollen (OW), Typ 2 Diabetiker (T2D), Waist to Hip Ratio (WHR),

Signifikanz von T2D gegenüber OW = \*, von OW gegenüber NW = #, von T2D gegenüber NW = §

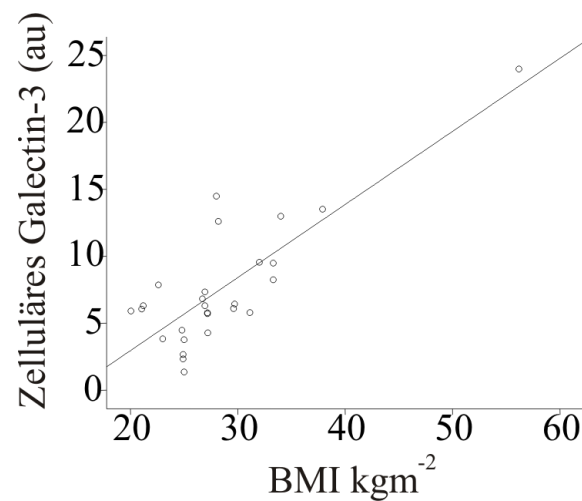
Die von den Monozyten gewonnen Überstände wurden mittels ELISA hinsichtlich der löslichen Galectin-3-Menge gemäß der drei Kollektive ausgewertet. Dabei wurden in den Überständen der Spender mit normalem Körpergewicht und ebenso derer mit Übergewicht ähnliche Konzentrationen an löslichem Galectin-3 gemessen. Jedoch waren die Werte in der Gruppe der Typ 2 Diabetiker signifikant geringer, verglichen mit den beiden anderen Kollektiven (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Extrazelluläres Galectin-3 in den Überständen primärer Monozyten von Typ 2 Diabetikern (T2D), übergewichtigen Kontrollen (OW) und normalgewichtigen Kontrollen (NW)

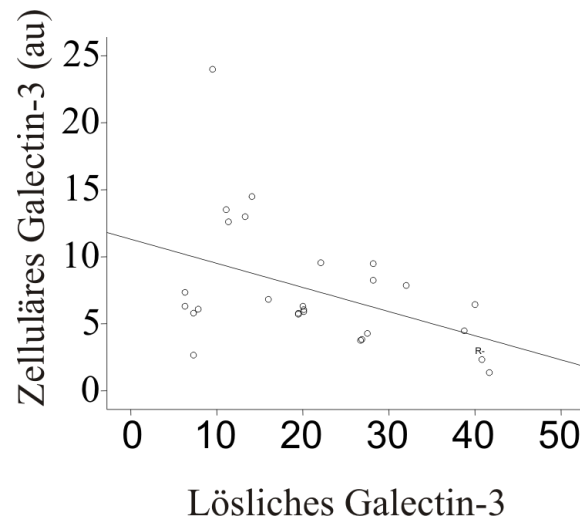
### 3.4.3 Korrelationen von zellulärem und löslichem Galectin-3 zu anthropometrischen und biochemischen Charakteristika der Spender

In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob eine Beziehung zwischen Galectin-3 und den angeführten Parametern in den bereits oben behandelten Kollektiven hergestellt werden kann. Zelluläres Galectin-3 zeigte dabei eine positive Korrelation zum BMI der Spender, wie Abbildung 27 zu entnehmen ist ( $r = 0,81$ ,  $p < 0,001$ ).



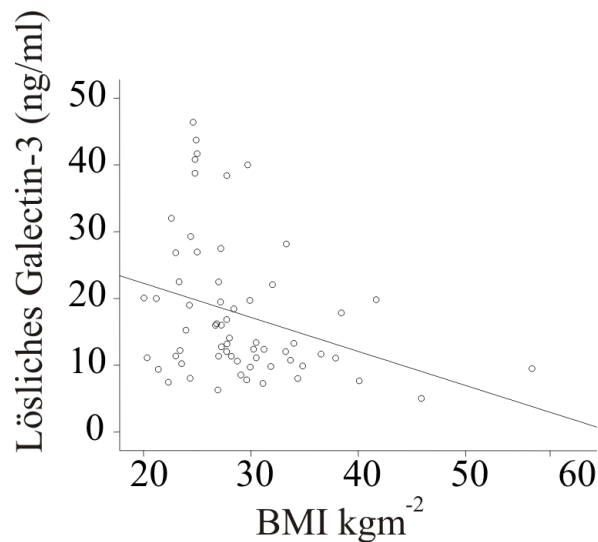
**Abbildung 27:** Korrelation des zellulären Galectin-3 zum BMI der Spender, Angaben in arbitrary units (au)

Im Verhältnis zu den beiden Kontrollgruppen NW und OW ergaben sich bei den Spendern mit Diabetes mellitus Typ 2 signifikant geringere Konzentrationen an löslichem Galectin-3 in den Überständen der Monozyten. Der Vergleich von zellulärem zu löslichem Galectin-3 resultierte in einer negativen Korrelation zwischen den beiden Parametern ( $r = -0,56$ ,  $p = 0,004$ , Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Korrelation von zellulärem und löslichem Galectin-3, Angaben in au

Ein deutlicher Zusammenhang zwischen zellulärem Galectin-3 und dem Body Mass Index der Spender konnte bereits aufgezeigt werden. Die Analyse des löslichen Galectin-3 brachte zum Vorschein, dass dieses jedoch nur schwach negativ mit dem BMI der Spender korrelierte ( $r =$ ,  $p =$ , Abbildung 29).



**Abbildung 29:** Korrelation von löslichem Galectin-3 zum BMI der Spender, Angaben in arbitrary units (au)

Weder zelluläres noch lösliches Galectin-3 korrelierten mit systemischen Adiponectinwerten, LDL-, HDL- oder Nüchtern-Blutzucker-Spiegel der einzelnen Spender aus den drei Kollektiven.

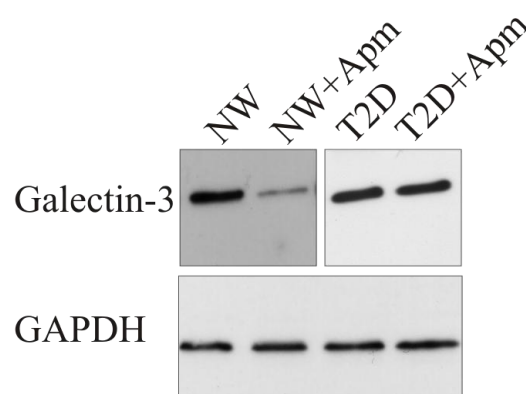


### 3.5 Effekt von Adiponectin auf monozytäres Galectin-3 in den drei Versuchsgruppen

Exogen zugeführtes Adiponectin führte in den in vitro Versuchen zu einer Reduktion sowohl von zellulärem als auch von löslichem Galectin-3. Aus dieser Erkenntnis heraus wuchs die Intention, den Effekt von exogenem Adiponectin auf die Galectin-3-Expression von Monozyten, differenziert nach Normalgewichtigen, Übergewichtigen und Typ 2 Diabetikern, zu untersuchen und mögliche Unterschiede im Stimulationsverhalten der Zellen zu veranschaulichen.

#### 3.5.1 Gestörte Adiponectin-vermittelte Suppression von zellulärem Galectin-3 in Monozyten von Typ 2 Diabetikern

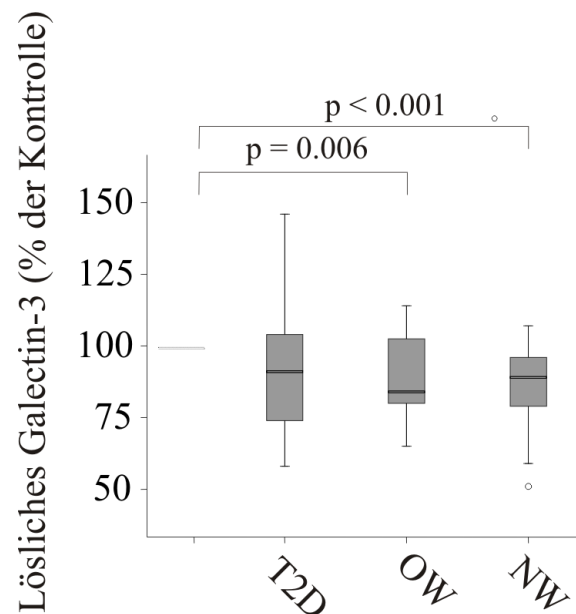
Um die Wirkung von Adiponectin auf Monozyten unter einer diabetogenen Stoffwechsellage zu untersuchen, wurden Monozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und von normalgewichtigen Spendern mit Adiponectin inkubiert. Eine Analyse der Zelllysate mittels Western Blot zeigte bei vier Typ 2 Diabetikern, dass der Effekt von Adiponectin auf die Galectin-3-Expression aufgehoben war und die Stimulation zu keiner Verminderung des zellulären Galectin-3 führte, wohingegen bei zwei Spendern noch eine geringe Reduktion beobachtet werden konnte. In den normalgewichtigen Kontrollen bewirkte Adiponectin eine deutliche Herabregulation des zellulären Galectin-3. Ein repräsentativer Auszug ist in Abbildung 30 dargestellt.



**Abbildung 30:** Western Blot gegen Galectin-3 und GAPDH mit Zelllysaten primärer Monozyten eines normalgewichtigen Spenders (NW) und eines Typ 2 Diabetikers (T2D) inkubiert mit PBS (Kontrollen) oder 10 µg/ml Adiponectin (Apm) für 24 h

### 3.5.2 Gestörte Reduktion von löslichem Galectin-3 durch Adiponectin in Monozyten von Typ 2 Diabetikern

Da nicht nur die zelluläre Galectin-3-Konzentration von Adiponectin beeinflusst wird, sondern auch der extrazelluläre Galectin-3-Spiegel, wurden von allen Spendern, die in Tabelle 2 aufgelistet sind, die Zellüberstände, sortiert nach den drei Kollektiven, untersucht. Eine Bestimmung der löslichen Galectin-3-Werte mittels ELISA ergab, dass Adiponectin signifikant Galectin-3 in den Überständen der Spender mit normalem Körpergewicht sowie derjenigen mit Übergewicht verringerte, während sich dieser Effekt nicht signifikant in den Monozyten der Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 nachweisen ließ (Abbildung 31).



**Abbildung 31:** Lösliches Galectin-3 in den Überständen Adiponectin stimulierter Monozyten von Typ 2 Diabetikern (T2D), übergewichtigen (OW) und normalgewichtigen (NW) Probanden in % der Zellen, die ohne Adiponectin inkubiert waren (definiert als 100%, Kontrolle)

## **4 Diskussion**

### **4.1 Regulation von Galectin-3 durch Adiponectin**

#### **4.1.1 Galectin-3 – ein proinflammatorisches Protein**

Galectin-3 ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, das eine Vielfalt von biologischen Funktionen erfüllt. Die jeweilige Rolle kann dabei auch von der Lokalisation des Proteins abhängen, da Galectin-3 im Zellkern, im Zytoplasma, an der Zelloberfläche sowie im Extrazellularraum aufgefunden werden kann. [101] Galectin-3 wird von verschiedensten Geweben und Zellen exprimiert. Zellen des Immunsystems, hier insbesondere die Monozyten, zeigen eine hohe Galectin-3-Synthese. Differenzieren Monozyten zu Makrophagen, so ist dies mit einem Anstieg von Galectin-3 verbunden. [87] Des Weiteren kann eine Zunahme dieses Proteins bei Makrophagen mit hoher Phagozytoseaktivität und Superoxidproduktion beobachtet werden, wodurch Galectin-3 als Aktivitätsparameter der myeloischen Zellen betrachtet werden kann. [102] Dies wird durch die Beobachtung, dass die Aktivierung der monozytären THP-1 Zellen durch Phorbol ester oder LDL-Partikel die Galectin-3-Expression induziert, bestätigt. [89]

Galectin-3 besitzt im Allgemeinen stark inflammatorische Eigenschaften. Es wird durch diverse inflammatorische Stimuli freigesetzt und entfaltet seine Wirkung in Zellen des Immunsystems durch wahrscheinlich autokrine und parakrine Mechanismen. Exogen zugeführtes Galectin-3 triggert den so genannten „Respiratory Burst“ in Monozyten, wirkt seinerseits positiv chemotaktisch auf Monozyten und Makrophagen und erhöht die Chemokin-Expression in diesen Zellen. [100-101]

#### **4.1.2 Reduktion des monozytären Galectin-3 durch Adiponectin**

Das Fehlen von Galectin-3 im Atherosklerosemodell der Apolipoprotein E knock out Mäuse ist mit weniger atheromatösen Plaques und mit einer geringeren Zahl perivaskulärer entzündlicher Infiltrate assoziiert. [98] Zudem wird in instabilen Plaques mehr Galectin-3 von Makrophagen produziert als in stabilen. [100] Galectin-3 scheint auch eine Rolle bei der Pathogenese des Diabetes einzunehmen. Tiere, bei denen durch Streptozotocin ein Diabetes ausgelöst wird, sind beim Fehlen von Galectin-3 vor einer Hyperglykämie geschützt. [99] Während die Mehrzahl der

bisher gewonnenen Daten darauf hindeutet, dass Galectin-3 einen unterstützenden Effekt für das Auftreten metabolischer Erkrankungen wie Atherosklerose und Diabetes mellitus Typ 2 ausübt, ist das Adipokin Adiponectin für seine antiatherosklerotischen und antidiabetischen Eigenschaften bekannt. Weil sich seine systemischen Werte bei Übergewicht, Diabetes mellitus Typ 2 und Atherosklerose verringern, war das Anliegen dieser Arbeit, den Einfluss von Adiponectin auf Galectin-3 zu evaluieren.

In den vorangegangenen Experimenten konnte eindrücklich gezeigt werden, dass eine Inkubation von Monozyten mit Adiponectin dazu führt, dass Galectin-3 auf mRNA-Ebene, intrazellulär und auch in seiner löslichen Form herabreguliert wird. Dabei verringert sich der zytoplasmatische Anteil von Galectin-3 um etwa 30 % und der in den Extrazellularraum abgegebene Teil um etwa 10 bis 20 %, wenn Monozyten mit 10 µg/ml Adiponectin für 24 Stunden inkubiert werden. Die Abnahme von zellulärem und gleichzeitig löslichem Galectin-3 könnte darauf hindeuten, dass eine verringerte Proteinsynthese und damit geringere zytoplasmatische Spiegel an Galectin-3 zu einer reduzierten Freisetzung in den Extrazellularraum führen. Dem widerspricht jedoch die Tatsache, dass lösliches und zelluläres Galectin-3 eine inverse Korrelation aufweisen und demnach niedrige zelluläre Spiegel eher mit hohen löslichen Galectin-3-Werten assoziiert sind. Daher ist anzunehmen, dass Adiponectin neben der Herabregulation der zellulären Galectin-3-Synthese auch die Galectin-3-Freisetzung reduzieren oder seine Degradierung induzieren könnte.

## **4.2 Mögliche Signaltransduktion der Adiponectin-vermittelten Wirkung auf Galectin-3**

### **4.2.1 Rolle der AMPK im metabolischen Geschehen**

Die durch AMP aktivierbare Proteinkinase (AMPK) nimmt eine Schlüsselrolle im Energiehaushalt ein. Diesem Enzym wird eine zentrale Bedeutung im Rahmen der Entstehung von Übergewicht, dem metabolischen Syndrom bzw. Typ 2 Diabetes mellitus beigemessen und gilt als möglicher Ansatzpunkt der Therapie. Abgesehen davon, dass der Abfall des zellulären Energiezustandes in Form einer Akkumulation von AMP zu Aktivierung der AMPK führt und vice versa ATP als Ausdruck einer ausreichenden Versorgung die Enzymaktivität inhibiert, können Hormone wie Leptin und Adiponectin ebenso die AMPK regulieren. Wird die AMPK aktiviert, so werden

stark energiekonsumierende Prozesse wie Glukoneogenese und Fettsäuresynthese vermindert. Stattdessen finden ATP generierende Stoffwechselwege wie Glykolyse und Oxidation von Fettsäuren in vermehrtem Ausmaß statt. [103-105]

Die AMPK stellt einen heterotrimeren Komplex aus den drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  dar. Die  $\alpha$ -Untereinheit übernimmt dabei die katalytische Funktion, welche durch die beiden anderen Untereinheiten moduliert wird. Hierzu enthält die  $\beta$ -Untereinheit eine auf Glykogen sensible Domäne, während die  $\gamma$ -Untereinheit Bindungsstellen für das aktivierende AMP und das inhibierende ATP besitzt. Die Bindung von AMP an die  $\gamma$ -Einheit führt zu einer Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit an Threonin 172 über die Kinase LKB1. Außerdem kann ein Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration eine Phosphorylierung an Threonin 172 durch die Calmodulin abhängige Kinase  $\beta$  bewirken. [106-107]

#### **4.2.2 Agonisten der AMPK**

Als weitere Agonisten der AMPK sind die Adipokine Leptin und Adiponectin [108], das 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-1- $\beta$ -D-Ribofuranosid (AICAR) [109] und die oralen Antidiabetikagruppen der Biguanide und Glitazone [107] zu nennen. AICAR wird in der Forschung häufig als Aktivator der AMPK verwendet. Nach seiner Aufnahme in die Zelle wird es zu AICA-Ribosid-Monophosphat phosphoryliert und aktiviert die AMPK, ohne dabei die Nukleotidspiegel zu verändern. AICAR stimuliert die Glukoseaufnahme in Skelettmuskelzellen und steigert die IL-6-Produktion in Fibroblasten. Zudem reduziert es die Anzahl toxischer Sauerstoffradikale und bewahrt die Zelle somit vor oxidativen Schäden und letztendlich vor deren Untergang durch Apoptose. [110]

Metformin als bekanntester Vertreter der oralen Antidiabetika ist nach heutigem Forschungsstand das Mittel erster Wahl bei übergewichtigen Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus. Es gehört zur Gruppe der Biguanide und wirkt antidiabetisch, indem es die periphere Insulinresistenz vermindert. Dieser Effekt wird unter anderem durch Aktivierung der AMPK vermittelt und hilft so, die metabolische Gesamtsituation zu verbessern. [103, 111]

Adiponectin wird ausschließlich von Adipozyten exprimiert und besitzt eine Reihe von Eigenschaften, die metabolisch als günstig angesehen werden. So ist dieses Adipokin imstande, die Glukosewerte sowie die freien Fettsäuren im Serum zu erniedrigen. Zudem kann eine Gewichtsreduktion und Verbesserung der

Insulinsensitivität beobachtet werden. Adiponectin entfaltet seine Wirkung über die beiden ubiquitär vorkommenden Rezeptorsubtypen AdipoR1 und AdipoR2. Die höchste Expression von AdipoR1 ist im Skelettmuskel nachzuweisen. Dort wird durch die Stimulation des Rezeptors das metabolische Schlüsselenzym AMPK aktiviert, das wiederum die Fettsäureoxidation und Glykolyse fördert. Der zweite Rezeptorsubtyp, AdipoR2, erreicht seine höchste Dichte in der Leber, wo eine Aktivierung mit einer Verbesserung der Insulinsensitivität durch AMPK- und erhöhte PPAR $\alpha$ -Ligand-Aktivität verbunden ist. [17, 29, 112]

#### **4.2.3 Beteiligung der AMPK an der Regulation von Galectin-3 durch Adiponectin**

Sowohl Adiponectin, AICAR als auch Metformin vermindern die Galectin-3-Expression. Da es sich hierbei um potente AMPK-Aktivatoren handelt, liegt die Vermutung nahe, dass in der Regulation von Galectin-3 die Aktivierung der AMPK von Bedeutung ist. Des Weiteren wird die Reduktion von Galectin-3 durch Adiponectin durch den AMPK-Inhibitor Compound C [113] aufgehoben. Da dieser Inhibitor jedoch per se eine Verminderung von Galectin-3 bewirkt, sollten diese Versuche mit weiteren Inhibitoren wiederholt werden. Dieses Ergebnis ist ein Indiz dafür, dass Compound C die Zellphysiologie auch unabhängig von der Inhibierung der AMPK beeinflusst. Diese These wird durch andere Publikationen belegt. Zum Beispiel verhindert Compound C die hormoninduzierte Differenzierung von Präadipozyten durch einen Anstieg des Zyklin abhängigen Kinase Inhibitors p21, ohne dass die Inaktivierung der AMPK daran beteiligt ist. [113] Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass in der Signaltransduktionskaskade im Rahmen der Herabregulation von Galectin-3 durch Adiponectin eine Beteiligung der AMPK als sehr wahrscheinlich anzusehen ist. Es bedarf aber zur endgültigen Klärung weiterer Versuche mit noch spezifischeren AMPK-Antagonisten, um die angeführte These zu bestätigen.

#### **4.2.4 Der p38 MAP-Kinase-Signalweg**

Die p38 MAP-Kinase ist ein Vertreter der Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen). Sie gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und zeichnen sich dadurch aus, dass sie ihre Zielproteine an spezifischen Serin/Threonin-Resten

phosphorylieren. Die MAP-Kinasen selbst wiederum werden von MAPK-Kinasen durch Phosphorylierung an zwei Aminosäuren, Tyrosin und Threonin, aktiviert. Damit ihre Funktionalität gewährleistet ist, müssen beide Reste gleichzeitig im phosphorylierten Zustand vorliegen. Erst dann kommt es zu einer Akkumulation der MAP-Kinasen im Zellkern, wo sie verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren und damit die Transkription einer Vielzahl von Proteinen kontrollieren. [114]

Die p38 MAP-Kinase-Phosphorylierung wird durch viele zelluläre Stressoren und inflammatorische Stimuli wie LPS, TNF- $\alpha$ , Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), dem Thrombozyten-aktivierenden Faktor (PAF), N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP) und Interleukin-8 (IL-8) vermittelt. In ihrer physiologischen Rolle ist die p38 MAP-Kinase an wichtigen zellulären Regulationsmechanismen beteiligt. Als Beispiel hierfür dient die Steuerung der zellulären Apoptose, welche bei neutrophilen Granulozyten ein wichtiger Prozess ist, um die toxische Wirkung und letztendlich die immunologische Antwort zu überwachen. Bei der spontanen Apoptose dieser Zellen kommt es zu einer Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase. Zusätzlich ist die ischämische Präkonditionierung am Myokard mit einer Aktivierung dieses Enzyms verbunden. Vermittelt wird dieser positive Effekt unter anderem über eine Induktion der NO-Synthase und über eine gesteigerte Translokation des Glukosetransporters Glut4 ins Sarkolemm, wodurch die intrazelluläre Glukoseaufnahme verbessert wird. [115-116]

#### **4.2.5 Vermittlung der Adiponectinwirkung auf Galectin-3 durch die p38 MAP-Kinase**

Die Aktivierung der AMPK involviert die p38 MAP-Kinase. Wie Du et al. zeigen konnten, führt eine Aktivierung der AMPK mit AICAR oder Metformin zu einer erhöhten IL-6-Synthese. Beim dabei zugrunde liegenden Signalweg spielt die Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase durch die AMPK eine wesentliche Rolle. [110] In ähnlicher Weise ist Adiponectin in der Lage, über den AdipoR1 eine Aktivierung der AMPK herbeizuführen, welche über die p38 MAP-Kinase eine Erhöhung der IL-6-Produktion bewirkt. [108]

In humanen Monozyten können sowohl AdipoR1 wie auch AdipoR2 nachgewiesen werden. [117] Eine Stimulation der Zellen mit Adiponectin ist mit einer Reduktion der zellulären Galectin-3-Werte assoziiert. Dieser Effekt von Adiponectin auf Galectin-3 kann durch den p38 MAP-Kinase-Inhibitor SB 203580 deutlich verringert werden. In

diesem Zusammenhang scheint es daher wahrscheinlich, dass die Aktivierung der p38 MAP-Kinase ein wesentlicher Bestandteil in der Regulation von Galectin-3 durch Adiponectin ist. Wie bereits Tang et al. zeigen konnten, ist Adiponectin imstande, über eine Bindung an AdipoR1 die AMPK und die p38 MAP-Kinase zu aktivieren und auf diese Weise unter anderem die IL-6-Produktion in Fibroblasten zu steuern. [108] Dies lässt die Annahme zu, dass auch das Protein Galectin-3 durch Adiponectin über einen Signalweg reguliert werden könnte, der, über den AdipoR1 vermittelt, eine Aktivierung der AMPK und der p38 MAP-Kinase beinhaltet.

### **4.3 Veränderungen von Galectin-3 im Kontext des metabolischen Syndroms**

Das metabolische Syndrom beschreibt einen Komplex von Risikofaktoren, von denen jeder einzelne für sich genommen bereits mit einer erhöhten Prävalenz kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität einhergeht, die in ihrer Summe jedoch eine potenzierende Wirkung entfalten. Die Kernelemente des auch als tödlichen Quartetts bezeichneten Risikoprofils beinhalten Adipositas, Dyslipidämie, Hypertonie und eine gestörte Glukosetoleranz. [1] In der Pathogenese des Krankheitsbildes stellt eine Dysbalance im Energiehaushalt, wie sie bei entsprechender ungesunder Lebensweise zu beobachten ist, meist den Ausgangspunkt zur Entstehung dar. Bewegungsmangel und Übergewicht reichen aus, um alle Aspekte des Syndroms zu generieren. [4]

#### **4.3.1 Rolle von Adiponectin in der Pathogenese des metabolischen Syndroms**

Das weiße Fettgewebe ist, wie früher angenommen wurde, nicht lediglich ein reines Speicherorgan, sondern nimmt auch aktiv an der Energiehomöostase sowie an immunologischen und inflammatorischen Prozessen teil. Durch die Sekretion von Adipokinen und zahlreichen Zytokinen trägt es bei Adipositas entscheidend zur Entstehung von Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes bei. [118]

Adiponectin ist eines der Adipokine, dessen Genprodukt am stärksten im Fettgewebe gebildet wird und mit 0,01% der Gesamtproteinmenge einen beträchtlichen Anteil im Blutplasma einnimmt. Als Hormon zeichnet es sich durch seine antiinflammatorischen und antiatherogenen Eigenschaften aus und wirkt bei der



Entstehung von Insulinresistenz protektiv. Bei Übergewichtigen und Typ 2 Diabetikern werden im Vergleich zu Normalgewichtigen geringere Adiponectinspiegel gemessen. [119-120] Umgekehrt steigert eine Restriktion an Kalorien und ein damit verbundener Gewichtsverlust die Serumkonzentration.

#### **4.3.2 Galectin-3-Spiegel in den drei Kollektiven**

Verringerte systemische Adiponectinwerte und die Ausprägung einer Resistenz gegenüber Adiponectin könnten die erhöhten basalen zellulären Galectin-3-Werte, wie sie in Monozyten von Übergewichtigen und Typ 2 Diabetikern nachgewiesen werden konnten, zumindest teilweise erklären. Des Weiteren wurden in den Monozytenüberständen der Probanden mit Diabetes mellitus Typ 2 reduzierte Spiegel an löslichem Galectin-3 gemessen. Die Tatsache, dass zelluläres und lösliches Galectin-3 eine negative Korrelation aufweisen, kann als Indiz dafür angesehen werden, dass auch die Freisetzung von Galectin-3 bei Diabetes mellitus Typ 2 beeinträchtigt ist. Die gestörte Externalisation könnte also ebenso dazu beitragen, dass die zellulären Galectin-3-Werte ansteigen. Das zelluläre Galectin-3 korreliert positiv mit dem BMI der entsprechenden Spender, weshalb Faktoren, die speziell bei Adipositas und Typ 2 Diabetes verändert sind, wahrscheinlich die monozytären Galectin-3-Spiegel beeinflussen. Das lösliche Galectin-3 jedoch zeigt lediglich einen mäßigen Zusammenhang mit dem BMI, was auf einen komplexen Mechanismus der Galectin-3-Freisetzung schließen lässt.

Es ist bekannt, dass Adiponectinrezeptoren in Monozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 geringer exprimiert werden als in Zellen von normalgewichtigen Kontrollen. Diese Reduktion der Rezeptordichte liefert einen Hinweis auf die Ausbildung einer möglichen Resistenz gegenüber Adiponectin im Rahmen des metabolischen Syndroms. [117] Unterstützt wird dieses Erkenntnis dadurch, dass eine Stimulation der Monozyten von Typ 2 Diabetikern mit Adiponectin das zelluläre wie auch das lösliche Galectin-3 in weitaus geringerem Maße im Vergleich zu den Kontrollen reduzierte, beziehungsweise der Effekt von Adiponectin auf die Galectin-3-Expression sogar aufgehoben war.

### **4.3.3 Zusammenhang von Adiponectin und Galectin-3**

In der gegenwärtigen Arbeit konnte weder eine Korrelation von zellulärem noch von löslichem Galectin-3 in den Überständen der Monozyten mit systemischen Adiponectinkonzentrationen festgestellt werden. Es ist bekannt, dass Adiponectin in verschiedenen Isoformen vorliegt. Im Blut zirkuliert es entweder als Homotrimer (LMW) oder bildet durch Disulfidbrücken Hexamere (MMW) aus. Daneben existieren auch multimere Formen von Adiponectin (HMW), bestehend aus vier bis sechs Homotrimeren. Während manche Funktionen, wie die Regulation der Apoptose und die Aktivierung der AMPK, von allen Isoformen bewirkt werden, gibt es auch individuelle, Isoform-spezifische Effekte. Zu diesen zählen unter anderem, dass die Oligomerisierung von Adiponectin zur Bindung an E-Cadherin sowie zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zwingend erforderlich ist. [23, 28, 112] Des Weiteren scheint vor allem HMW-Adiponectin biologisch aktiv zu sein, da insbesondere die HMW-Komplexe den Körper gegenüber Insulin sensibilisieren und damit einer Resistenz entgegensteuern. Sie korrelieren besser als die Gesamtmenge an Adiponectin negativ mit Parametern des metabolischen Syndroms. Erniedrigte Mengen sind darüber hinaus ein prädiktiver Faktor für einen gestörten Glukosestoffwechsel. [26-27] Für die Experimente in dieser Arbeit wurde ausschließlich Adiponectin voller Länge, das Hexamere und Multimere bildet, verwendet. Dieser Umstand vermag zumindest ansatzweise erklären, weshalb es nicht gelang, eine Assoziation zwischen zellulärem Galectin-3 und den Spiegeln des Gesamtadiponectin nachzuweisen.

### **4.3.4 Das metabolische Syndrom als inflammatorische Reaktion**

Adipositas ist eine Form einer geringgradigen, chronisch progredient verlaufenden Entzündungsreaktion, die sich im gesamten Organismus abspielt. Dies ist daran zu erkennen, dass inflammatorische Parameter wie Lipopolysaccharid, diverse Zytokine, Chemokine und freie Fettsäuren im Serum bei Adipositas in erhöhten Konzentrationen detektiert werden können. Für den Anstieg verantwortlich sind einerseits die Adipozyten selbst, da sie neben ihrer Funktion als Energiespeicher auch zahlreiche Zytokine wie zum Beispiel TNF- $\alpha$ , IL-6 und MCP-1 sezernieren, und andererseits Makrophagen, die das Fettgewebe, unter anderem durch MCP-1 angelockt, verstärkt infiltrieren und ihrerseits durch eine hohe Produktion inflammatorischer Zytokine die Entzündungsreaktion fördern. In Kombination mit dem

veränderten Sekretionsprofil an Adipokinen beeinflusst die latente chronische Inflammation den gesamten Metabolismus und beschleunigt die Entwicklung einer Insulinresistenz. [119, 121]

Freie Fettsäuren sind in gesteigerter Menge bei adipösen Menschen nachzuweisen. Die erhöhten Spiegel sind mitunter ursächlich für das Auftreten einer Störung in der Glukoseverwertung in allen bedeutenderen Zielorganen von Insulin wie Skelettmuskel und Leber. Daher stellen freie Fettsäuren ein wichtiges Bindeglied zwischen den einzelnen Elementen des metabolischen Syndroms dar. [122] Dyslipidämie als ein Hauptcharakteristikum des metabolischen Syndroms ist durch einen Überschuss an LDL- bei erniedrigten HDL-Partikeln gekennzeichnet. Bedeutender als die Absolutwerte von LDL und HDL ist ihr Verhältnis zueinander. Dies lässt sich durch die Funktion der beiden Lipoproteinarten erklären. Während HDL für den Transport von Cholesterin aus dem peripheren Gewebe zur Leber verantwortlich ist, trägt LDL zur Verteilung von Cholesterin im gesamten Organismus bei und entfaltet auf diese Weise seine atherogene Wirkung, wobei in atheromatösen Plaques vor allem oxidierte LDL-Partikel vorgefunden werden können. Der Quotient von HDL zu LDL reflektiert somit das Verteilungsmuster von Cholesterin im Organismus und ist ein Prädiktor zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos.[123]

#### **4.3.5 Einfluss inflammatorischer Stimuli auf die Galectin-3-Expression**

Es ist bekannt, dass LPS die zelluläre Expression von Galectin-3 reduziert. [87, 101] Außerdem konnte kein Effekt von freien Fettsäuren auf die endogenen Galectin-3-Konzentrationen nachgewiesen werden. Es können daher weder die erhöhten LPS-Spiegel noch der Anstieg von freien Fettsäuren, Veränderungen, die im Zusammenhang des metabolischen Syndroms auftreten, zur Erklärung der hohen zellulären Galectin-3-Expression in Monozyten von Typ 2 Diabetikern herangezogen werden.

Atherogene Lipoproteine wie oxidiertes LDL und acetyliertes LDL bewirken eine Steigerung von zellulärem Galectin-3. [89] Dies kann einen Beitrag dazu leisten, dass in Monozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und übergewichtigen Probanden erhöhte Konzentrationen an Galectin-3 festgestellt werden. Nichtsdestoweniger verändern sich die Galectin-3-Werte nicht, wenn in Monozyten, die nicht mit Lipiden beladen sind, Cholesterin aus der Zelle oder der

Plasmamembran entfernt wird. Daher wird Galectin-3 nicht lediglich über den zellulären Cholesteringehalt reguliert. Darüber hinaus werden signifikant höhere Galectin-3-Spiegel in Monozyten von Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu übergewichtigen Kontrollen gemessen. Diese Tatsache legt nahe, dass spezielle Faktoren, welche nur im Rahmen des Typ 2 Diabetes nicht aber bei Adipositas verändert sind, wie zum Beispiel Hyperglykämie, involviert sein könnten.

#### **4.4 Rolle von Galectin-3 im Rahmen des metabolischen Syndroms**

##### **4.4.1 Beteiligung von Galectin-3 an der Regulation von Apoptose**

Lösliches Galectin-3 ist ein Protein mit proapoptotischer Wirkung, endogenes Galectin-3 hingegen schützt vor Apoptose. Eine Störung des Gleichgewichts von intrazellulärem und extrazellulärem Galectin-3 kann somit gravierende Folgen auf die Steuerung des natürlichen Zelluntergangs und den Zellumsatz haben. Die im Zusammenhang des metabolischen Syndroms aufgezeigte Dysbalance der Galectin-3-Verteilung ist wahrscheinlich in der Lage, die Apoptose von Monozyten hinauszuzögern und die Lebenszeit dieser Zellen von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 zu verlängern. [101, 124] Dies kann mitunter begründen, weshalb bei Typ 2 Diabetikern die Anzahl von Monozyten erhöht ist, wie es Shim et al. herausfanden. Damit verbunden ist auch eine gesteigerte Sekretion inflammatorischer Zytokine. Der Anstieg von Immunzellen korreliert mit entscheidenden Parametern des metabolischen Syndroms wie Blutdruck, Nüchternblutzucker, Insulinprofil und Dyslipidämie und ist ein Maß für die im Körper ablaufende Entzündungsreaktion. [125-126] Adiponectin induziert den programmierten Zelltod durch Apoptose in myeloischen Zelllinien und myelomonocytyären Vorläuferzellen. [127] Es wurde jedoch bisher in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht, inwieweit hier eine Veränderung von Galectin-3 durch Adiponectin beteiligt ist. Die Reduktion von antiapoptotischem zellulärem und proapoptotischem löslichem Galectin-3 in Monozyten durch das Adipokin Adiponectin ist aber nicht mit dem Tod der Zellen durch Lyse assoziiert, wodurch eine zytotoxische Wirkung von Adiponectin ausgeschlossen werden kann. [23]

#### **4.4.2 Assoziation von Diabetes und der Entstehung eines Immundefizits**

Lösliches Galectin-3 entfaltet eine positiv chemotaktische Wirkung auf Monozyten und Makrophagen und stimuliert die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren in diesen Zellen. Die wichtige Stellung in der körpereigenen Immunantwort resultiert auch aus der Eigenschaft heraus, Glykokonjugate, die Galaktosidmotive enthalten, auf Pathogenen wie *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Salmonella* Spezies zu erkennen. Ebenso ist Galectin-3 bei der Bindung von *Pseudomonas aeruginosa* an Epithelzellen beteiligt. Zudem interagiert es mit Komponenten der Glykolipidhülle von *Mycobacterium tuberculosis* und akkumuliert im Krankheitsverlauf in Phagosomen von Makrophagen, die mit Pathogenen beladen sind. [101] Diabetes ist eine Erkrankung, die mit einer Beeinträchtigung des Immunsystems vergesellschaftet ist. Da die Impfreaktion weitgehend erhalten bleibt, wird angenommen, dass sich die Störung überwiegend auf die native Immunabwehr bezieht. Die immunologische Depression äußert sich in verschiedenen Aspekten der Leukozytenfunktion wie einer Reduktion der Adhärenz, Chemotaxis und Phagozytosefähigkeit – Eigenschaften, die unter anderem auch durch Galectin-3 vermittelt werden. Betrachtet man Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, so gibt es Erkrankungen, die häufiger als in der Allgemeinbevölkerung oder sogar fast exklusiv in dieser Gruppe auftreten, und welche, die vor allem durch einen erschwerten Verlauf oder durch ein erhöhtes Risiko für Komplikationen auf sich aufmerksam machen. Bei Erkrankungen des Respirationstrakts treten bestimmte Mikroorganismen wie *Staphylococcus aureus*, gramnegative Bakterien und *Mycobacterium tuberculosis* vermehrt auf. Im Bereich der unteren Harnwege ist bei Diabetikern die Inzidenz einer Bakteriurie erhöht, während Infektionen der oberen Harnwege einen schwereren Verlauf zeigen können sowie in der Regel stärker mit Komplikationen behaftet sind. Haupterreger aller Harnwegsinfektionen ist in der großen Mehrzahl der Fälle das Bakterium *Escherichia coli*. Die seltene, meist durch *Pseudomonas aeruginosa* verursachte Otitis externa maligna tritt hauptsächlich bei Patienten mit Diabetes mellitus auf. [128] Allen Erkrankungen gemein ist, dass sie überwiegend durch Erreger ausgelöst werden, die über spezielle Oberflächenstrukturen und unter anderem auch durch Galectin-3 erkannt werden können. In diesem Zusammenhang leisten die verminderten Konzentrationen an löslichem Galectin-3 bei Typ 2 Diabetikern möglicherweise einen Beitrag zur Suppression des Immunsystems und sind eventuell mitverantwortlich für die Prädisposition zu bestimmten Krankheitsbildern beziehungsweise Erregern.

## 5 Zusammenfassung

Adipositas ist eines der bedeutendsten, gesundheitspolitischen Probleme von Industrienationen in unserer Zeit und es ist davon auszugehen, dass durch eine steigende Prävalenz in den kommenden Jahren die Bedeutung der mit Adipositas assoziierten Folgeerkrankungen noch weiter zunehmen wird. Den vollen Ausprägungsgrad dieses Krankheitsbildes stellt das metabolische Syndrom dar, das seinerseits das Auftreten von zahlreichen, damit assoziierten Komplikationen begünstigt. Angesichts dieser Tatsachen ist es ein wichtiges Unterfangen, die Zusammenhänge zwischen Adipositas und der Ausprägung des metabolischen Syndroms zu erforschen, um neue Therapieoptionen zu gewinnen und präventive Maßnahmen ergreifen zu können.

Adipositas ist eine Form einer latent verlaufenden, chronisch progredienten Entzündungsreaktion, wie an der Zunahme von Entzündungsparametern im Serum ersichtlich ist. Daneben spielt in der Pathogenese ein verändertes Sekretionsprofil von Adipokinen wie Adiponectin eine wesentliche Rolle. Das Hormon Adiponectin zeichnet sich durch seine antiinflammatorischen, antidiabetogenen und antiatherosklerotischen Effekte aus. Bei Adipositas sind verminderte Serumwerte des Hormons messbar. Galectin-3 ist ein Protein mit proinflammatorischen Eigenschaften und scheint an der Entwicklung einer gestörten Glukosetoleranz beteiligt zu sein. Daher war es Ziel dieser Arbeit, die Wirkung von Adiponectin auf Galectin-3 zu analysieren. Hierzu wurden primäre Monozyten in vitro mit Adiponectin stimuliert und die zellulären sowie löslichen Galectin-3-Spiegel untersucht. Des Weiteren wurden drei Kollektive bestehend aus Normalgewichtigen, Übergewichtigen und Typ 2 Diabetikern erstellt, um Veränderungen im Stoffwechsel, wie sie bei der Entstehung des metabolischen Syndroms auftreten, detektieren zu können. Anschließend wurde die Galectin-3-Expression in den drei Gruppen erhoben und miteinander verglichen. Die in vitro Ergebnisse demonstrierten, dass Adiponectin Galectin-3 auf mRNA-Ebene sowie die zelluläre und extrazelluläre Proteinmenge reduziert. Die inverse Korrelation von endogenem zu exogenem Galectin-3 deutet darauf hin, dass Adiponectin neben der Proteinsynthese von Galectin-3 auch dessen Freisetzung oder Degradierung regulieren könnte.

Die durchgeführten Untersuchungen zur Charakterisierung des zugrunde liegenden Signalwegs von Adiponectin erachteten eine Beteiligung der AMPK für

wahrscheinlich, da AMPK-Agonisten wie Metformin und AICAR in gleicher Weise wie Adiponectin die Galectin-3-Menge verringern, während der AMPK-Inhibitor Compound C imstande ist, die Wirkung von Adiponectin auf Galectin-3 aufzuheben. Ein weiteres Bindeglied in der Signaltransduktion scheint die p38 MAP-Kinase zu sein. Es kann daher angenommen werden, dass Adiponectin über den Adiponectinrezeptor AdipoR1 die AMPK und p38 MAP-Kinase aktiviert und hierdurch eine Verminderung der Galectin-3-Expression bewirkt. Zur Bestätigung der Hypothese ist jedoch die Durchführung zusätzlicher Experimente mit weiteren, mehr spezifischen Inhibitoren notwendig.

Die Auswertung der Daten in den drei Kollektiven ergab eine signifikante Erhöhung der basalen zellulären Galectin-3-Werte bei Monozyten von Übergewichtigen und Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrollen, wohingegen das lösliche Galectin-3 abnahm. Die Veränderungen von Galectin-3 lassen sich zumindest teilweise durch eine Verringerung von Adiponectin erklären, obwohl es nicht gelang, eine Korrelation von zellulärem oder löslichem Galectin-3 zur Adiponectingesamtmenge zu erheben. Ein Grund hierfür mag sein, dass Adiponectin Isoform-spezifische Effekte ausüben kann und in den Versuchen Adiponectin eingesetzt wurde, das Hexamere und Komplexe mit höherem Molekulargewicht bildet. Die Reduktion von löslichem Galectin-3 bei Typ 2 Diabetikern in Kombination mit der negativen Korrelation von löslichem zu zellulärem Galectin-3 kann eventuell als ein Hinweis für eine Störung der Galectin-3-Freisetzung im Rahmen des metabolischen Syndroms gewertet werden. Sowohl zelluläres als auch lösliches Galectin-3 korrelieren mit dem BMI der Spender, wohingegen kein Zusammenhang mit LDL, HDL und Nüchtern-Blutzucker-Werten besteht. Weder eine Stimulation mit freien Fettsäuren noch eine Cholesterindepletion zeigten Auswirkung auf Galectin-3, so dass die Galectin-3-Spiegel nicht den Grad der Dyslipidämie widerspiegeln. Im Vergleich zu den Kontrollkollektiven konnte bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 exogen zugeführtes Adiponectin keine Abnahme von zellulärem wie auch löslichem Galectin-3 erreichen. Diese Tatsache lässt die Entstehung einer Adiponectinresistenz bei Typ 2 Diabetikern vermuten.

Der Anstieg von antiapoptotischem zellulärem und die Reduktion von proapoptotischem löslichem Galectin-3 im Rahmen von Diabetes mellitus Typ 2 kann wahrscheinlich die Regulation der Apoptose von Immunzellen beeinflussen und auf diese Weise die chronisch inflammatorische Reaktion unterstützen. Darüber hinaus

---

ist vorstellbar, dass eine Verminderung von löslichem Galectin-3, welches an der Infektabwehr durch die Bindung an Pathogenen und die Aktivierung von phagozytären Zellen beteiligt ist, mit zur Störung des Immunsystems bei Typ 2 Diabetikern beiträgt.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Day, C., *Metabolic syndrome, or What you will: definitions and epidemiology*. Diab Vasc Dis Res, 2007. **4**(1): p. 32-8.
2. Toplak, H., *Das Metabolische Syndrom – Beginn des tödlichen Quartetts?* Journal für Kardiologie, 2005. **12**: p. 6-7.
3. Baillie, G.M., J.T. Sherer, and C.W. Weart, *Insulin and coronary artery disease: is syndrome X the unifying hypothesis?* Ann Pharmacother, 1998. **32**(2): p. 233-47.
4. Moller, D.E. and K.D. Kaufman, *Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective*. Annu Rev Med, 2005. **56**: p. 45-62.
5. Schenk, S., M. Saberi, and J.M. Olefsky, *Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation*. J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 2992-3002.
6. Europäische Ministerkonferenz der WHO zur Bekämpfung der Adipositas, *Die Herausforderung Adipositas und Strategien zur Bekämpfung in der Europäischen Region der WHO*. 2006.
7. Rajala, M.W. and P.E. Scherer, *Minireview: The adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis*. Endocrinology, 2003. **144**(9): p. 3765-73.
8. Berg, A.H. and P.E. Scherer, *Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease*. Circ Res, 2005. **96**(9): p. 939-49.
9. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
10. Harman-Boehm, I., et al., *Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(6): p. 2240-7.
11. Feinstein, R., et al., *Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates*. J Biol Chem, 1993. **268**(35): p. 26055-8.
12. Fantuzzi, G., *Adipose tissue, adipokines, and inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(5): p. 911-9; quiz 920.
13. Sabio, G., et al., *A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance*. Science, 2008. **322**(5907): p. 1539-43.
14. Arkan, M.C., et al., *IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 191-8.

15. Trujillo, M.E. and P.E. Scherer, *Adiponectin-journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome*. J Intern Med, 2005. **257**(2): p. 167-75.
16. Scherer, P.E., et al., *A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26746-9.
17. Whitehead, J.P., et al., *Adiponectin-a key adipokine in the metabolic syndrome*. Diabetes Obes Metab, 2006. **8**(3): p. 264-80.
18. Schaffler, A., et al., *Identification and characterization of the human adipocyte apM-1 promoter*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1399**(2-3): p. 187-97.
19. Vasseur, F., et al., *The genetics of adiponectin*. Curr Diab Rep, 2003. **3**(2): p. 151-8.
20. Arita, Y., et al., *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(1): p. 79-83.
21. Nakano, Y., et al., *Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma*. J Biochem, 1996. **120**(4): p. 803-12.
22. Zhang, Z. and W.J. Henzel, *Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites*. Protein Sci, 2004. **13**(10): p. 2819-24.
23. Neumeier, M., et al., *Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(4): p. 803-8.
24. Wang, Y., et al., *Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19521-9.
25. Pajvani, U.B., et al., *Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9073-85.
26. Fisher, F.F., et al., *Serum high molecular weight complex of adiponectin correlates better with glucose tolerance than total serum adiponectin in Indo-Asian males*. Diabetologia, 2005. **48**(6): p. 1084-7.
27. Hara, K., et al., *Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome*. Diabetes Care, 2006. **29**(6): p. 1357-62.
28. Suzuki, S., et al., *The oligomeric structure of high molecular weight adiponectin*. FEBS Lett, 2007. **581**(5): p. 809-14.
29. Kadowaki, T. and T. Yamauchi, *Adiponectin and adiponectin receptors*. Endocr Rev, 2005. **26**(3): p. 439-51.

- 
30. Sanz, P., *AMP-activated protein kinase: structure and regulation*. Curr Protein Pept Sci, 2008. **9**(5): p. 478-92.
  31. Bruun, J.M., et al., *Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(3): p. E527-33.
  32. Kern, P.A., et al., *Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression*. Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1779-85.
  33. Combs, T.P., et al., *Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin*. Diabetes, 2003. **52**(2): p. 268-76.
  34. Cnop, M., et al., *Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex*. Diabetologia, 2003. **46**(4): p. 459-69.
  35. Bacha, F., et al., *Adiponectin in youth: relationship to visceral adiposity, insulin sensitivity, and beta-cell function*. Diabetes Care, 2004. **27**(2): p. 547-52.
  36. Weyer, C., et al., *Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(5): p. 1930-5.
  37. Hotta, K., et al., *Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys*. Diabetes, 2001. **50**(5): p. 1126-33.
  38. Hotta, K., et al., *Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(6): p. 1595-9.
  39. Tiikkainen, M., et al., *Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes*. Diabetes, 2004. **53**(8): p. 2169-76.
  40. Xu, A., et al., *Selective elevation of adiponectin production by the natural compounds derived from a medicinal herb alleviates insulin resistance and glucose intolerance in obese mice*. Endocrinology, 2009. **150**(2): p. 625-33.
  41. Barondes, S.H., et al., *Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins*. J Biol Chem, 1994. **269**(33): p. 20807-10.
  42. Leffler, H., et al., *Introduction to galectins*. Glycoconj J, 2004. **19**(7-9): p. 433-40.
  43. Barondes, S.H., et al., *Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins*. Cell, 1994. **76**(4): p. 597-8.

- 
44. Abedin, M.J., et al., *Potential roles of galectins in myeloid differentiation into three different lineages*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(5): p. 650-6.
  45. Rabinovich, G.A., N. Rubinstein, and L. Fainboim, *Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(5): p. 741-52.
  46. Rabinovich, G.A., *Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy*. Cell Death Differ, 1999. **6**(8): p. 711-21.
  47. Hirabayashi, J. and K. Kasai, *The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution*. Glycobiology, 1993. **3**(4): p. 297-304.
  48. Hughes, R.C., *Mac-2: a versatile galactose-binding protein of mammalian tissues*. Glycobiology, 1994. **4**(1): p. 5-12.
  49. Sato, S., I. Burdett, and R.C. Hughes, *Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex*. Exp Cell Res, 1993. **207**(1): p. 8-18.
  50. Sato, S. and R.C. Hughes, *Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages*. J Biol Chem, 1994. **269**(6): p. 4424-30.
  51. Sato, S. and R.C. Hughes, *Control of Mac-2 surface expression on murine macrophage cell lines*. Eur J Immunol, 1994. **24**(1): p. 216-21.
  52. Cooper, D.N. and S.H. Barondes, *Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism*. J Cell Biol, 1990. **110**(5): p. 1681-91.
  53. Lindstedt, R., et al., *Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway*. J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 11750-7.
  54. Nickel, W., *The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes*. Eur J Biochem, 2003. **270**(10): p. 2109-19.
  55. Mehul, B. and R.C. Hughes, *Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion*. J Cell Sci, 1997. **110** ( Pt 10): p. 1169-78.
  56. Hughes, R.C., *The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules*. Biochem Soc Trans, 1997. **25**(4): p. 1194-8.

- 
57. Foddy, L., S.C. Stamatoglou, and R.C. Hughes, *An endogenous carbohydrate-binding protein of baby hamster kidney (BHK21 C13) cells. Temporal changes in cellular expression in the developing kidney.* J Cell Sci, 1990. **97 ( Pt 1)**: p. 139-48.
  58. Hubert, M., et al., *Intranuclear distribution of galectin-3 in mouse 3T3 fibroblasts: comparative analyses by immunofluorescence and immunoelectron microscopy.* Exp Cell Res, 1995. **220**(2): p. 397-406.
  59. Cowles, E.A., et al., *Carbohydrate-binding protein 35. Isoelectric points of the polypeptide and a phosphorylated derivative.* J Biol Chem, 1990. **265**(29): p. 17706-12.
  60. Hamann, K.K., et al., *Expression of carbohydrate binding protein 35 in human fibroblasts: variations in the levels of mRNA, protein, and isoelectric species as a function of replicative competence.* Exp Cell Res, 1991. **196**(1): p. 82-91.
  61. Yu, F., et al., *Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation.* J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 15819-27.
  62. Gaudin, J.C., B. Mehul, and R.C. Hughes, *Nuclear localisation of wild type and mutant galectin-3 in transfected cells.* Biol Cell, 2000. **92**(1): p. 49-58.
  63. Huflejt, M.E., et al., *L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I.* J Biol Chem, 1993. **268**(35): p. 26712-8.
  64. Mazurek, N., et al., *Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands.* J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 36311-5.
  65. Hughes, R.C., *Lectins as cell adhesion molecules.* Curr. Opin. Struct. Biol., 1992. **2**: p. 687-692.
  66. Feizi, T., et al., *The adhesive specificity of the soluble human lectin, IgE-binding protein, toward lipid-linked oligosaccharides. Presence of the blood group A, B, B-like, and H monosaccharides confers a binding activity to tetrasaccharide (lacto-N-tetraose and lacto-N-neotetraose) backbones.* Biochemistry, 1994. **33**(20): p. 6342-9.
  67. Henrick, K., et al., *Evidence for subsites in the galectins involved in sugar binding at the nonreducing end of the central galactose of oligosaccharide ligands: sequence analysis, homology modeling and mutagenesis studies of hamster galectin-3.* Glycobiology, 1998. **8**(1): p. 45-57.
  68. Barboni, E.A., et al., *Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with the C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding.* Glycobiology, 2000. **10**(11): p. 1201-8.

- 
69. Birdsall, B., et al., *NMR solution studies of hamster galectin-3 and electron microscopic visualization of surface-adsorbed complexes: evidence for interactions between the N- and C-terminal domains*. Biochemistry, 2001. **40**(15): p. 4859-66.
  70. Knibbs, R.N., et al., *Carbohydrate-binding protein 35. II. Analysis of the interaction of the recombinant polypeptide with saccharides*. J Biol Chem, 1993. **268**(20): p. 14940-7.
  71. Hsu, D.K., R.I. Zuberi, and F.T. Liu, *Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin*. J Biol Chem, 1992. **267**(20): p. 14167-74.
  72. Ochieng, J., et al., *Structure-function relationship of a recombinant human galactoside-binding protein*. Biochemistry, 1993. **32**(16): p. 4455-60.
  73. Massa, S.M., et al., *L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity*. Biochemistry, 1993. **32**(1): p. 260-7.
  74. Kuklinski, S. and R. Probstmeier, *Homophilic binding properties of galectin-3: involvement of the carbohydrate recognition domain*. J Neurochem, 1998. **70**(2): p. 814-23.
  75. Chiariotti, L., et al., *Control of galectin gene expression*. Biochimie, 1999. **81**(4): p. 381-8.
  76. Raimond, J., et al., *The second intron of the human galectin-3 gene has a strong promoter activity down-regulated by p53*. FEBS Lett, 1995. **363**(1-2): p. 165-9.
  77. Chiariotti, L., et al., *Activation of the galectin-1 (L-14-I) gene from nonexpressing differentiated cells by fusion with undifferentiated and tumorigenic cells*. Cell Growth Differ, 1994. **5**(7): p. 769-75.
  78. Yamaoka, A., et al., *A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils*. J Immunol, 1995. **154**(7): p. 3479-87.
  79. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., *Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during Trypanosoma cruzi infection*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 493-502.
  80. Frigeri, L.G., R.I. Zuberi, and F.T. Liu, *Epsilon BP, a beta-galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells*. Biochemistry, 1993. **32**(30): p. 7644-9.
  81. Jin, R., et al., *Human monocytes recognize porcine endothelium via the interaction of galectin 3 and alpha-GAL*. J Immunol, 2006. **177**(2): p. 1289-95.
  82. Woo, H.J., et al., *The major non-integrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2)*. J Biol Chem, 1990. **265**(13): p. 7097-9.

- 
83. Kiwaki, K., et al., *Galectin-3 stimulates preadipocyte proliferation and is up-regulated in growing adipose tissue*. Obesity (Silver Spring), 2007. **15**(1): p. 32-9.
  84. Pugliese, G., et al., *The diabetic milieu modulates the advanced glycation end product-receptor complex in the mesangium by inducing or upregulating galectin-3 expression*. Diabetes, 2000. **49**(7): p. 1249-57.
  85. Pugliese, G., et al., *Accelerated diabetic glomerulopathy in galectin-3/AGE receptor 3 knockout mice*. FASEB J, 2001. **15**(13): p. 2471-9.
  86. Iacobini, C., et al., *Role of galectin-3 in diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(8 Suppl 3): p. S264-70.
  87. Liu, F.T., et al., *Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages*. Am J Pathol, 1995. **147**(4): p. 1016-28.
  88. Nangia-Makker, P., et al., *Regulation of the expression of galactoside-binding lectin during human monocytic differentiation*. Cancer Res, 1993. **53**(20): p. 5033-7.
  89. Kim, K., E.P. Mayer, and M. Nachtigal, *Galectin-3 expression in macrophages is signaled by Ras/MAP kinase pathway and up-regulated by modified lipoproteins*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1641**(1): p. 13-23.
  90. Warfel, A.H. and D. Zucker-Franklin, *Specific ligation of surface alpha-D-galactosyl epitopes markedly affects the quantity of four major proteins secreted by macrophages*. J Leukoc Biol, 1992. **52**(1): p. 80-4.
  91. Tabor, D.R., et al., *Macrophage membrane glycoprotein binding of Griffonia simplicifolia I-B4 induces TNF-alpha production and a tumoricidal response*. J Cell Physiol, 1992. **152**(3): p. 500-6.
  92. Li, Y., et al., *Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2781-9.
  93. MacKinnon, A.C., et al., *Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2650-8.
  94. Sano, H., et al., *Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages*. J Immunol, 2000. **165**(4): p. 2156-64.
  95. Karlsson, A., et al., *Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils*. Glycobiology, 2009. **19**(1): p. 16-20.
  96. Mina-Osorio, P., I. Soto-Cruz, and E. Ortega, *A role for galectin-3 in CD13-mediated homotypic aggregation of monocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **353**(3): p. 605-10.

- 
97. Gavrilu, A., et al., *Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(10): p. 4823-31.
  98. Nachtigal, M., A. Ghaffar, and E.P. Mayer, *Galectin-3 gene inactivation reduces atherosclerotic lesions and adventitial inflammation in ApoE-deficient mice*. Am J Pathol, 2008. **172**(1): p. 247-55.
  99. Mensah-Brown, E.P., et al., *Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice*. Clin Immunol, 2009. **130**(1): p. 83-8.
  100. Papaspyridonos, M., et al., *Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. 433-40.
  101. Dunic, J., S. Dabelic, and M. Flögel, *Galectin-3: an open-ended story*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1760**(4): p. 616-35.
  102. Elliott, M.J., A. Strasser, and D. Metcalf, *Selective up-regulation of macrophage function in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transgenic mice*. J Immunol, 1991. **147**(9): p. 2957-63.
  103. Viollet, B., et al., *Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders*. Diabetes Metab, 2007. **33**(6): p. 395-402.
  104. Hardie, D.G. and D. Carling, *The AMP-activated protein kinase-fuel gauge of the mammalian cell?* Eur J Biochem, 1997. **246**(2): p. 259-73.
  105. Miranda, N., et al., *AMPK as a cellular energy sensor and its function in the organism*. Rev Invest Clin, 2007. **59**(6): p. 458-69.
  106. Towler, M.C. and D.G. Hardie, *AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. 328-41.
  107. Hardie, D.G., *AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism*. Int J Obes (Lond), 2008. **32 Suppl 4**: p. S7-12.
  108. Tang, C.H., et al., *Adiponectin enhances IL-6 production in human synovial fibroblast via an AdipoR1 receptor, AMPK, p38, and NF-kappa B pathway*. J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5483-92.
  109. Sag, D., et al., *Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype*. J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8633-41.
  110. Du, J.H., et al., *AICAR stimulates IL-6 production via p38 MAPK in cardiac fibroblasts in adult mice: a possible role for AMPK*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **337**(4): p. 1139-44.



- 
111. Foretz, M., et al., *[Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]*. Med Sci (Paris), 2006. **22**(4): p. 381-8.
  112. Tsao, T.S., et al., *Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30)*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 29359-62.
  113. Nam, M., et al., *Compound C inhibits clonal expansion of preadipocytes by increasing p21 level irrespectively of AMPK inhibition*. Arch Biochem Biophys, 2008. **479**(1): p. 74-81.
  114. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 153-83.
  115. Aoshiba, K., et al., *Role of p38-mitogen-activated protein kinase in spontaneous apoptosis of human neutrophils*. J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1692-700.
  116. McFalls, E.O., et al., *Activation of p38 MAPK and increased glucose transport in chronic hibernating swine myocardium*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(3): p. H1328-34.
  117. Weigert, J., et al., *Reduced response to adiponectin and lower abundance of adiponectin receptor proteins in type 2 diabetic monocytes*. FEBS Lett, 2008. **582**(12): p. 1777-82.
  118. Antuna-Puente, B., et al., *Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity*. Diabetes Metab, 2008. **34**(1): p. 2-11.
  119. Gil-Campos, M., R.R. Canete, and A. Gil, *Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity*. Clin Nutr, 2004. **23**(5): p. 963-74.
  120. Shimada, K., T. Miyazaki, and H. Daida, *Adiponectin and atherosclerotic disease*. Clin Chim Acta, 2004. **344**(1-2): p. 1-12.
  121. Al-Attas, O.S., et al., *Changes in endotoxin levels in T2DM subjects on anti-diabetic therapies*. Cardiovasc Diabetol, 2009. **8**: p. 20.
  122. Boden, G., *Obesity and free fatty acids*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2008. **37**(3): p. 635-46, viii-ix.
  123. Alwaili, K., et al., *Approach to the diagnosis and management of lipoprotein disorders*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2009. **16**(2): p. 132-40.
  124. Hsu, D.K., et al., *Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses*. Am J Pathol, 2000. **156**(3): p. 1073-83.
  125. Shim, W.S., et al., *The association of total and differential white blood cell count with metabolic syndrome in type 2 diabetic patients*. Diabetes Res Clin Pract, 2006. **73**(3): p. 284-91.

- 
126. Pickup, J.C., *Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2004. **27**(3): p. 813-23.
  127. Yokota, T., et al., *Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1723-32.
  128. Joshi, N., et al., *Infections in patients with diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1999. **341**(25): p. 1906-12.

## 7 Anhang

### Eigene Publikationen

**Weber, M.**, Sporrer, D., Weigert, J., Stögbauer, F., Wanninger, J., Neumeier, M., Schäffler, A., Schölmerich, J., Buechler, C.,

Adiponectin downregulates galectin-3 whose cellular form is elevated whereas its soluble form is reduced in type 2 diabetic monocytes.

FEBS Lett, 2009. **538**(22): p. 3718-24.

Sporrer, D., **Weber, M.**, Wanninger, J., Weigert, J., Neumeier, M., Stögbauer, F., Bala, M., Kopp, A., Schäffler, A., Buechler, C.,

Adiponectin downregulates CD163 whose cellular and soluble forms are elevated in obesity.

Eur J Clin Invest, 2009. **39**(8): p. 671-9.

Stögbauer, F., Weigert, J., Neumeier, M., Wanninger, J., Sporrer, D., **Weber, M.**, Schäffler, A., Enrich, C., Wood, P., Grewal, T., Aslanidis, C., Buechler, C.,

Annexin A6 is highly abundant in monocytes of obese and type 2 diabetic individuals and is downregulated by adiponectin in vitro.

Exp Mol Med, 2009. **41**(7): p. 501-7.

Weigert, J., Neumeier, M., Wanninger, J., Schober, F., Sporrer, D., **Weber, M.**, Schramm, A., Wurm, S., Stögbauer, F., Filarsky, M., Schäffler, A., Aslanidis, C., Schölmerich, J., Buechler, C.,

Adiponectin upregulates monocytic activin A but systemic levels are not altered in obesity or type 2 diabetes.

Cytokine, 2009. **45**(2): p. 86-91.

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name: Markus Weber  
Geburtsdatum: 28.03.1985  
Geburtsort: Rotthalmünster  
Familienstand: ledig  
Adresse: Carossastr. 2a, 94474 Vilshofen  
Email: Markus.Weber@stud.uni-regensburg.de

### Ausbildung

#### *Hochschulstudium*

10/2004-11/2010 Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg  
11/2010 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 1,0  
10/2006 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 1,0

#### *Schulbildung*

09/1995-07/2004 Maristengymnasium Fürstenzell, Abitur Note 1,0 mit  
Stipendium der bayerischen Begabtenförderung

### Praktische Erfahrung

#### *Praktisches Jahr*

05/2010-07/2010 Universität Regensburg, Orthopädie, Prof. Dr. Grifka  
04/2010-05/2010 University of San Diego, Gastroenterology, Prof Dr. Ho  
03/2010-04/2010 University of San Diego, Infectious Diseases,  
Prof. Dr. Fierer  
02/2010-03/2010 Universität Regensburg, Innere Med I,  
Prof. Dr. Schölmerich  
12/2009-02/2010 Universität Regensburg, Orthopädie, Prof. Dr. Grifka  
09/2009-12/2009 Kantonsspital Liestal, Chirurgie, Prof. Dr. Maurer

#### *Famulaturen*

03/2009 University of Dubai, General Surgery, Prof. Dr. Hartung  
09/2008 Universität Regensburg, Orthopädie, Prof. Dr. Grifka  
03/2007 Allgemeinarztpraxis Dr. Karl Stöckl, Pleinting  
02/2007 Kreiskrankenhaus Vilshofen, Chirurgie, Dr. Kohlbacher

### Ehrenamtliche Tätigkeiten

seit 08/2008 Tutor im Studentischen Ausbildungs- und  
Trainingszentrum der Universität Regensburg (StATUR),  
Dr. Mandraka

---

**Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Christa Bächler für die exzellente Betreuung der Doktorarbeit und die umfassende Hilfestellung bei allen Problemen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von PD Dr. Christa Bächler für ihre Hilfe im Labor bedanken.

Ein großer Dank richtet sich auch an alle Spender, die sich zum Abnehmen von Blut für die Monozytenisolierung zur Verfügung gestellt haben.

Vor allem aber danke ich meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung, ohne die weder das Bestreiten des Medizinstudiums noch das Entstehen dieser Dissertation möglich gewesen wäre.

Den größten Dank schulde ich meiner Freundin, Kommilitonin und Laborkameradin Daniela für einfach alles.

---

**Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Sandbach, den 01.02.2011

---

Markus Weber